

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-253876

(P2000-253876A)

(43) 公開日 平成12年9月19日 (2000.9.19)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B 0 2 4
A 6 1 K 39/145		A 6 1 K 39/145	4 B 0 6 5
C 0 7 K 14/11		C 0 7 K 14/11	4 C 0 8 5
C 1 2 N 7/02		C 1 2 N 7/02	4 H 0 4 5
7/04		7/04	

審査請求 未請求 請求項の数19 O L (全 28 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平11-60918

(22) 出願日 平成11年3月8日 (1999.3.8)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成10年9月9日  
日本ウイルス学会発行の「日本ウイルス学会第46回学術  
集会・総会 プログラム・抄録集」に発表

(71) 出願人 595155107

株式会社ディナベック研究所

茨城県つくば市観音台1丁目25番11号

(72) 発明者 加藤 篤

東京都羽村市神明台2丁目5番33号 神明  
台住宅807

(72) 発明者 清谷 克寛

広島県広島市東区山根町6-17

(72) 発明者 吉田 哲也

広島県広島市東区牛田東3-8-7

(74) 代理人 100102978

弁理士 清水 初志 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 センダイウイルスベクターを用いたワクチンおよびワクチンタンパク質

(57) 【要約】

【課題】 インフルエンザワクチンの製造に有用なセンダイウイルスベクター、該ベクターを用いたインフルエンザワクチンを製造方法、該ベクターを用いて製造されるインフルエンザワクチン、並びにセンダイウイルスベクターを利用して得ることができる免疫原および免疫分析用タンパク質を提供することを課題とする。

【解決手段】 インフルエンザウイルスのヘマグルチニン (HA) 遺伝子を導入した組み換えセンダイウイルスベクターを用いることにより、強毒型インフルエンザに対するワクチンを製造することに成功した。本発明のワクチンを経鼻接種されたマウスは、強毒型インフルエンザウイルスに対して有意な抵抗力を示した。また、センダイウイルスベクターを利用して生産されたタンパク質は強い免疫反応性を有しており、ワクチン用途の免疫原タンパク質や免疫分析用タンパク質に適していることが判明した。特にHIV感染の血清診断薬用のELISA等の抗原として有用であることが判明した。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 インフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を発現可能に保持するセンダイウイルスベクター。

【請求項2】 インフルエンザウイルスが強毒型である、請求項1に記載のセンダイウイルスベクター。

【請求項3】 インフルエンザウイルスが亜型H5または亜型H7である、請求項2に記載のセンダイウイルスベクター。

【請求項4】 タンパク質がA型インフルエンザウイルスのHAタンパク質である、請求項1から3のいずれかに記載のセンダイウイルスベクター。

【請求項5】 請求項1から4のいずれかに記載のセンダイウイルスベクターを用いるインフルエンザワクチンの製造方法。

【請求項6】 (a) センダイウイルスベクターを鶏卵に接種する工程、(b) センダイウイルス複合体を鶏卵中で増殖させる工程、および(c) 増殖したセンダイウイルスベクターを鶏卵の漿尿液から回収する工程、を含む、請求項5に記載の方法。

【請求項7】 回収したセンダイウイルスベクターを不活化する工程をさらに含む、請求項6に記載の方法。

【請求項8】 センダイウイルスベクターからインフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を精製する工程をさらに含む、請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】 請求項1から4のいずれかに記載のセンダイウイルスベクターを含むインフルエンザワクチン。

【請求項10】 センダイウイルスの生ワクチンである、請求項9に記載のインフルエンザワクチン。

【請求項11】 不活化されたセンダイウイルスを含む、請求項9に記載のインフルエンザワクチン。

【請求項12】 請求項1から4のいずれかに記載のセンダイウイルスベクターから精製されたインフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を含むインフルエンザワクチン。

【請求項13】 請求項9から12のいずれかに記載のワクチンをヒト以外のインフルエンザウイルスの中間宿主に投与することを特徴とする、インフルエンザに対するワクチネーションの方法。

【請求項14】 ワクチンを気道に投与する、請求項13に記載の方法。

【請求項15】 ワクチンを複数回投与する、請求項13または14に記載の方法。

【請求項16】 センダイウイルスベクターに発現可能に組み込んだ病原体由来のタンパク質をコードする遺伝子が発現させることによって得ることができる、免疫原用タンパク質。

【請求項17】 センダイウイルスベクターに発現可能に組み込んだ病原体由来のタンパク質をコードする遺伝子が発現させることによって得ることができる、免疫分

析用タンパク質。

【請求項18】 請求項17に記載のタンパク質を含む、抗体の免疫学的分析用キット。

【請求項19】 請求項17に記載のタンパク質を含む、抗体のELISA用キット。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、インフルエンザワクチンの製造のために用いられるセンダイウイルスベクター、該ベクターを用いるインフルエンザワクチンの製造方法、および該ベクターを用いて製造されるインフルエンザワクチンに関する。また、センダイウイルスベクターを利用して得ることができる免疫原および免疫分析用タンパク質に関する。

【0002】

【従来の技術】オルトミクソウイルス科(Orthonymoviridae)に属するインフルエンザウイルスは、ヒトを含む多くの動物に感染し呼吸器感染症(インフルエンザ)を引き起こす病原ウイルスである。ウイルスが感染すると数日で発熱、頭痛、関節を含む全身各部の痛みや脱力感を引き起こし、咳やのどの痛み等の呼吸器症状を呈す。時として気管支炎、細菌性肺炎、中耳炎などを併発することが多く、さらに脳症、筋肉炎、心筋炎などを引き起こして重症化する場合もある。特に高齢者や妊婦、肺疾患や心疾患、腎疾患患者に感染すると重症化しやすく死亡率も高い。日本でも毎年数万人が罹患し2000人近くが死亡している。歴史的にも、1918年から始まったスペインかぜ、1957年のアジアかぜ、1968年の香港かぜ、1977年のソ連かぜと、今世紀に入ってから繰り返し汎流行(大流行)を起こし、日本も含めた世界各国において死亡者数や罹患患者数の面から莫大な健康被害と社会活動への影響を起こしている。

【0003】インフルエンザウイルスのうち特に汎流行を起こしやすいA型に属するものには、現在H1～H15の亜型(subtype)が知られている。ウイルスの宿主はヒト、ブタ、ミンク、クジラ、トリ等広く分布しており、とくにトリで多くの亜型が単離されている。これまでヒトで汎流行した亜型にはH1とH3があり、A香港型(H3N2)やAソ連型(H1N1)などがその代表として知られている。

【0004】現在、インフルエンザに対する予防方法としては、不活化インフルエンザワクチンが最も主流であり、疫学的にもその有効性は確立している。インフルエンザワクチンを製造するためには通常、インフルエンザウイルスを受精後10日前後の発育鶏卵の漿尿膜内に接種する。通常ウイルスは漿尿膜にのみ感染し、漿尿液中にウイルスが蓄積する。その後漿尿液からウイルスを回収し、濃縮してワクチンの原料となるウイルスが製造される。これから、ホリマリン等で不活化したウイルス全粒子ワクチンや、ウイルスを分解しHAタンパク質画分

ら製造されるHAサブユニットワクチン等が製造される。  
【0005】HAタンパク質とは血液凝集素（ヘマグルチニン；HA）を指し、ノイラミニダーゼ（NA）と共にインフルエンザウイルス粒子の表面に存在する外殻スパイクタンパク質である。

【0006】HAタンパク質は変異を起こしやすく、H1～H15内の同一亜型内であっても多少の変異が見られ（抗原ドリフト）、このため、インフルエンザワクチンが最も有効に機能するためには、ワクチンとして用いたウイルスのタイプが一致することが重要である。例えば、新

型のインフルエンザウイルスが出現した場合、感染を有効に予防するためには、そのウイルスと全く同じ抗原性を持つワクチンを新規に製造することが望ましい。  
【0007】インフルエンザウイルスは、10～40年の周期で不連続変異を起こし、新型インフルエンザウイルスが出現すると言われている（抗原シフト）。新型インフルエンザウイルスがどのような過程を経て出現し、ヒトへ感染するのかについては未だ十分に解明されていない。従来、これらのインフルエンザウイルスがブタ等の体内でヒトインフルエンザウイルスと遺伝子交雑を起こし、新型ウイルスとしてヒトへ感染することがあると言われてきたが、トリなどの他種動物を宿主とするインフルエンザウイルスが直接ヒトへ感染することも知られるようになった（K.Subbarao et al., Science 279: 393-396 (1998)）。

【0008】トリを宿主とする亜型H5や亜型H7等のインフルエンザウイルスは強毒型として知られている（Y. Kawaoka et al., Virology 158: 218-227 (1987); J.A. Walker and Y. Kawaoka, J. General Virol. 74: 311-314 (1993)）が、これらのウイルスがヒトへの感染性を獲得する可能性が危惧される。実際、1997年5月以降、それまでトリで確認されていたがヒトでは見つかっていなかった亜型H5インフルエンザウイルス（H5N1）の感染者が複数確認された。これらのインフルエンザウイルスに対するワクチンを一刻も早く製造することが求められている。

【0009】インフルエンザウイルスが細胞に感染するためには、HAタンパク質（HA0）がトリプシン様タンパク質分解酵素によって一部切断され、HA1およびHA2に開裂する必要があるとされる。HA1が細胞表面のシアル酸受容体に吸着すると、エンドサイトーシスによりウイルス粒子が細胞内リソゾームに取り込まれ、酸性条件下で膜融合が起こって感染が成立する。従来型のインフルエンザウイルスは、肺や上気道にのみ存在するトリプシン様タンパク質分解酵素によって、HAタンパク質のGln/Arg-X-ArgのC端側が切断され開裂し、隣接した細胞に再感染が成立するため、インフルエンザの感染部位は気道部周辺に限られていた（Robert A. Lamb and Robert M. Krug, 'Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication' in Fields Virology, Third ed., edited by

B.N. Fields et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.1353-1445, 1996)。それに対して H5N1新型インフルエンザやトリに見られる亜型H5や亜型H7の一部のウイルスは、HAタンパク質の開裂部位に塩基性アミノ酸（Arg-X-Lys/Arg-Arg）が並んで存在し、広い細胞種に存在するFurin様酵素により開裂されるため、感染が全身におよび致死率が非常に高くなることが知られている（Robert A. Lamb and Robert M. Krug, 'Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication' in Fields Virology, Third ed., edited by B.N. Fields et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.1353-1445, 1996）。

【0010】このようなウイルスに対するワクチンを製造するには、通常、上記のように鶏卵でウイルスを増殖させなければならない。ところが、亜型H5や亜型H7等の強毒型のウイルスは鶏卵に感染させると感染が胚へおよび、早期に胚が致死となるため、ワクチンを製造するために十分な量のウイルスを製造することが著しく困難であった。また安全上の観点からも強毒型ウイルスを直接取り扱わずにすむワクチンの製造方法が望まれている。

【0011】これまでに、プロテアーゼ切断部位に変異を導入して強毒型インフルエンザウイルス（H5N1）のHA遺伝子を弱毒型にしたインフルエンザワクチン株の製造が試行されている（西村秀一他、日本ウイルス学会第46回学術集会・総会, IIIE26, 1998）。しかし、このワクチン株はトリインフルエンザウイルスのゲノムを依然として含むことなどから、ヒトへの安全性を十分に確認する必要がある。

【0012】また、鶏卵を使わずにインフルエンザウイルスのタンパク質を生産する試みが、これまでに行われてきた。例えば水泡性口内炎ウイルス（Vesicular stomatitis virus; VSV）に亜型H1のインフルエンザウイルスHA遺伝子を組み込み、HAタンパク質を発現させ、インフルエンザワクチンの効果を検証した報告がある（Kretzschmar, E., et al., 1997, J. Virol. 71: 5982-5989; Roberts, A. et al., 1998, J. Virol. 72: 4704-4711）が、強毒型インフルエンザウイルスに関しては実験されていない。また、このベクターは投与したマウスへ全身感染するため、宿主に対するベクターの病原性が心配される。新型インフルエンザウイルス（H5N1）のワクチン製造はバキュロウイルスとカイコを使った系でも試みられている（日本経済新聞、1998年2月14日、朝刊、10面）が、ワクチン効果については現在まで確かめられていない。

【0013】非分節型の一本鎖RNAウイルスを利用したワクチンの例としては、G.W. Wertzらの特許（WO96/10400）が知られている。しかしながら、その主張する最適のワクチンは、構造タンパク質が一本鎖RNAウイルス由来のものである。また、WO96/10400の表1に示されたワ

クチン開発の候補となる病原の中にオルトミクソウイルスは言及されておらず、ことにインフルエンザ A 型 H5N1 は主張されていない。従って、上記文献は、非分節型一本鎖 RNA ウイルスの一般的なワクチンとしての利用の可能性を示しているだけであり、実施例中にも *in vivo* における効果は示されていない。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、強毒型インフルエンザウイルスに対するワクチンの製造に有用なセンダイウイルスベクター、該ベクターを用いたインフル

エンザワクチンの製造方法、該ベクターを用いて製造されるインフルエンザワクチン、ならびにセンダイウイルスベクターを利用して得ることができる免疫原用および免疫分析用タンパク質を提供することを課題とする。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らはこれまで、センダイウイルスがタンパク質の発現ベクターとして、また細胞や個体への遺伝子導入用ベクターとして非常に有用であることを示してきた（国際公開97/16538号および国際公開97/16539号参照）。センダイウイルスベクターは毒性が低く、導入した遺伝子から発現されるタンパク質量が極めて高い。また、宿主染色体へ導入されることがなく発現が一過的であるため、安全性にも優れている。センダイウイルスベクターが持つこのような特徴から本発明者らは、センダイウイルスベクターがインフルエンザウイルスに対するワクチンとして、また該ワクチンの生産ベクターとして有用であることを見出した。

【0016】本発明者らは、インフルエンザウイルスに対するワクチンを効率よく製造するために、センダイウイルスを用いてインフルエンザウイルスの遺伝子を有する組換え体を製造し、これらの組換え体を利用してインフルエンザウイルスタンパク質を含むセンダイウイルスの製造を行った。その結果、これらの組換え体を利用することにより、効率よく強毒型インフルエンザウイルスのタンパク質が製造されることを見出した。さらに、本発明のセンダイウイルスベクターを用いたワクチンは、強毒型インフルエンザウイルスに対して極めて高いワクチン効果が得られることを見出した。

【0017】また、本発明者らは、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）のエンベロープタンパク質 gp120を発現するセンダイウイルスベクターを作製し、該ベクターを用いてHIV感染者の血清の免疫反応性を調べたところ、該ベクター由来のgp120組換えタンパク質は、HIV感染者の血清と非常に強く、かつHIV-1の亜型特異的に反応することを見出した。

【0018】即ち本発明は、インフルエンザワクチンの製造のために用いられるセンダイウイルスベクター、該ベクターを用いるインフルエンザワクチンの製造方法、該ベクターを用いて製造されるインフルエンザワクチ

ン、ならびにセンダイウイルスベクターを利用して得ることができる免疫原用および免疫分析用タンパク質に関し、より具体的には、（１）インフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を発現可能に保持するセンダイウイルスベクター、（２）インフルエンザウイルスが強毒型である、（１）に記載のセンダイウイルスベクター、（３）インフルエンザウイルスが亜型H5または亜型H7である、（２）に記載のセンダイウイルスベクター、（４）タンパク質がA型インフルエンザウイルスのHAタンパク質である、（１）から（３）のいずれかに記載のセンダイウイルスベクター、（５）（１）から（４）のいずれかに記載のセンダイウイルスベクターを用いるインフルエンザワクチンの製造方法、（６）

（a）センダイウイルスベクターを鶏卵に接種する工程、（b）センダイウイルス複合体を鶏卵中で増殖させる工程、および（c）増殖したセンダイウイルスベクターを鶏卵の漿尿液から回収する工程、を含む、（５）に記載の方法、（７）回収したセンダイウイルスベクターを不活化する工程をさらに含む、（６）に記載の方法、（８）センダイウイルスベクターからインフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を精製する工程をさらに含む、（６）または（７）に記載の方法、

（９）（１）から（４）のいずれかに記載のセンダイウイルスベクターを含むインフルエンザワクチン、（１０）センダイウイルスの生ワクチンである、（９）に記載のインフルエンザワクチン、（１１）不活化されたセンダイウイルスを含む、（９）に記載のインフルエンザワクチン、（１２）（１）から（４）のいずれかに記載のセンダイウイルスベクターから精製されたインフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を含むインフルエンザワクチン、（１３）（９）から（１２）のいずれかに記載のワクチンをヒト以外のインフルエンザウイルスの中間宿主に投与することの特徴とする、インフルエンザに対するワクチネーションの方法、（１４）ワクチンを気道に投与する、（１３）に記載の方法、（１５）ワクチンを複数回投与する、（１３）または（１４）に記載の方法、（１６）センダイウイルスベクターに発現可能に組み込んだ病原体由来のタンパク質をコードする遺伝子が発現させることによって得ることができる、免疫原用タンパク質、（１７）センダイウイルスベクターに発現可能に組み込んだ病原体由来のタンパク質をコードする遺伝子が発現させることによって得ることができる、免疫分析用タンパク質、（１８）（１７）に記載のタンパク質を含む、抗体の免疫学的分析用キット、（１９）（１７）に記載のタンパク質を含む、抗体のELISA用キット、に関する。

【0019】なおワクチンとは、免疫反応を誘発する組成物を言う。また本発明において、強毒型インフルエンザウイルスとは、従来から知られる亜型H1N1やH3N2とは異なり、毒性の高いインフルエンザウイルスを言う。こ

のようなウイルスには亜型H5ウイルス、亜型H7ウイルス、鶏卵への接種により胚に感染が及ぶウイルス、HAタンパク質の開裂がFurin様酵素により触媒されるウイルスが含まれる。

【0020】インフルエンザA型のサブタイプH5ウイルスおよびH7ウイルスは、鳥類の強毒性に関係している。その理由はこれらの型のHAが外来のプロテアーゼの供給なしに開裂する性質によることが知られている (Fields Virology, vol.1, Chapter46, p1410, Table2; Nestorowicz, A. et al., Virology, 1987, 160: 411-418)。

従って、同様の開裂機構を有するインフルエンザウイルスは、強毒型としての性質を示し得ると考えられる。【0021】なお、インフルエンザの亜型は抗原性により定義されている (文献「Fields Virology, vol.1, Chapter 46, p1399」または「WHO Memorandum A revised system of nomenclature for influenza virus Bull WH 0 1980, 58, p585-591」を参照のこと)。

【0022】

【発明の実施の形態】本発明は、インフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を発現可能に保持するセンダイウイルスベクターを提供する。本発明において、「センダイウイルスベクター」とは、センダイウイルスに由来し、感染力を有する複合体を含む。また「感染力」とは、本明細書においては、複合体が細胞への接着能および膜融合能を保持していることにより、細胞内に複合体内部の核酸等を導入することのできる能力のことを言う。

【0023】インフルエンザウイルスタンパク質またはその一部を発現可能に保持するセンダイウイルスベクターは、インフルエンザワクチンの製造や診断用ウイルス抗原の製造に有用である。インフルエンザウイルスタンパク質は、インフルエンザウイルスゲノムがコードするタンパク質を言う。具体的にはキャプシドの核タンパク質 (NP)、マトリックス (M1)、ポリメラーゼ (PA, PB1, PB2)、ヘマグルチニン (HA)、ノイラミニダーゼ (NA) などのウイルス粒子構成タンパク質の他に、NS1, NS2, M2などが含まれる。インフルエンザワクチンの製造に用いるには、免疫原性を有するタンパク質またはその部分ペプチド等を用いる。上記のタンパク質は、いずれも免疫原性を有しており、これらのタンパク質またはその部分 (免疫原性を有する部分ペプチド) を、センダイウイルスベクターを用いて発現させ、ワクチンの製造を行うことができる。これらのタンパク質は単独で用いても、また複数を組み合わせて用いてもよい。本発明においては、特にインフルエンザウイルス粒子の外殻スパイクタンパク質であるHAおよび/またはNAを用いることが好ましい。より好ましくはHAが用いられる。

【0024】例えば、センダイウイルスベクターにおいてウイルスが自律的に複製するためには、NP、P/CおよびL遺伝子から作られるタンパク質群が必要だと考えら

れているが、該タンパク質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、本発明のベクターを、該タンパク質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞を用いて製造し、該宿主細胞から該タンパク質群が供給されてもよい。また、これらのタンパク質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

【0025】また、例えばセンダイウイルスベクターが伝播力を有するためには、M、FおよびHN遺伝子から作られるタンパク質群が必要だと考えられているが、該タンパク質群をコードする遺伝子自体は、本発明のウイルスベクターに必ずしも含まれている必要はない。例えば、本発明のベクターを、該タンパク質群をコードする遺伝子を有する宿主細胞を用いて製造し、該宿主細胞から該タンパク質群が供給されてもよい。また、これらのタンパク質群のアミノ酸配列は、ウイルス由来の配列そのままでも、核酸の導入における活性が天然型のそれと同等かそれ以上ならば、変異を導入したり、あるいは他のウイルスの相同遺伝子で代用してもよい。

【0026】インフルエンザウイルスタンパク質は、インフルエンザウイルスゲノム遺伝子をセンダイウイルスベクターへ導入することで発現させることができる。こうして作製された組換えウイルスゲノムを試験管内または細胞内で転写させ、ウイルスを再構成させることによって、組換えウイルスの複合体を得ることができる。このようなウイルス再構成は、既に開発されている (国際公開97/16539号参照)。

【0027】また、完全なセンダイウイルスゲノムではなくても、DI分子 (J. Virol. 68, 8413-8417, 1994) などの不完全ウイルスや、合成したオリゴヌクレオチド等も複合体を構成する成分として用いることが可能である。

【0028】センダイウイルスには伝播力に関わるM、F、HN遺伝子の全ての遺伝子が含まれた複合体を使用することができる。ここで、「伝播力」とは、「感染や人工的な手法で核酸が細胞内に導入された後、細胞内に存在する該核酸が複製後、感染粒子またはそれに準ずる複合体を形成し、別の細胞に伝播することのできる能力」を意味する。しかし、天然型が持つ伝播力を欠失または弱めるために、再構成された複合体に含まれるウイルスゲノムから、伝播力に関わる遺伝子を欠失または機能的に不活化させておくことができる。センダイウイルスの場合、伝播力に関わる遺伝子とは、M、F、および/またはHN遺伝子である。このような複合体の再構成法は既に開発されている (国際公開97/16538号参照)。例えばセンダイウイルスにおいて、再構成された複合体に含まれるウイルスゲノムから、Fおよび/またはHN遺伝子を欠失させたゲノムを有するベクターを作ることが

できる。このようなベクターも、本発明のベクターに含まれる。

【0029】複合体には、例えば、エンベロープ表面に特定の細胞に接着しうるような接着因子、リガンド、受容体等が含まれていても構わない。組換え体センダイウイルスは、たとえば免疫原性に関与する遺伝子を不活性化したり、RNAの転写効率や複製効率を高めるために、一部の遺伝子を改変したものでもよい。

【0030】導入するインフルエンザウイルスタンパク質は、該タンパク質をコードする遺伝子をセンダイウイルスベクターに含まれるRNAの適当な部位に挿入して発現させることができる。センダイウイルスRNAにおいては、R1配列とR2配列との間に、6の倍数の塩基数を有する配列を挿入することが望ましい（Journal of Virology, Vol. 67, No. 8, 1993, p. 4822-4830）。挿入した外来性遺伝子の発現量は、遺伝子挿入の位置、また遺伝子の前後のRNA塩基配列により調節しうる。例えば、センダイウイルスRNAにおいては、挿入位置がNP遺伝子に近いほど、挿入された遺伝子の発現量が多いことが知られている。

【0031】ベクターに含まれるRNAにコードされたインフルエンザウイルスタンパク質は、このベクターを宿主細胞に導入することにより発現させることができる。

【0032】ワクチンは、1種類のインフルエンザウイルス抗原を用いてもよいが、複数のタイプのインフルエンザウイルスを抗原として用いれば、より広い株のインフルエンザウイルスに対する免疫を獲得させることができる。複数のタイプのインフルエンザウイルスを抗原として用いる場合、その組み合わせに特に制限はなく、例えば、亜型H5と亜型H7など、HAの亜型の異なるウイルス由来の遺伝子を用いてワクチンを製造することができる。また、同じHAの亜型に属し、NAの亜型の異なるウイルスを用いることもできる。複数のインフルエンザウイルスの遺伝子は、それぞれ別々のセンダイウイルスベクターゲノム込んでワクチンを製造後、それらを混合することもできれば、同じセンダイウイルスベクターゲノムに複数の遺伝子を組み込んで発現させることもできる。

【0033】インフルエンザ亜型H5として知られている13種のウイルス株（A/HK/156/97（H5N1）、A/Ck/PA/83（H5N2）、A/Ck/Scot/59（H5N1）、A/Dk/Ir/83（H5N8）、A/Dk/MI/80（H5N2）、A/Ma11/WC/75（H5N3）、A/Tern/SA/61（H5N3）、A/Tk/Enq/91（H5N1）、A/Tk/Ir/83（H5N8）、A/Tk/MN/95（H5N2）、A/Tk/MN/81（H5N2）、A/Tk/On/66（H5N9）、A/Tk/WC/68（H5N9））のHAタンパク質のアミノ酸配列をマキシムマッチング法により比較したところ、いずれも互いに85%以上の同一性を示した。また、同様に亜型H7として知られる7種（A/Ck/Japan/24（H7N7）、A/FPV/Rostock/34（H7N1）、A/FPV/Weybridge（H7N7）、A/Tk/Enq/63（H7N3）、A/Dk/HK/293/78（H7N2）、A/Ck/Jena/87（H7N7）、A/Ck/Victoria/75（H7N7））のHAタンパク質のア

ミノ酸配列は、いずれも89%以上の同一性を示した。このように、同じHAの亜型の株の間では、HAタンパク質のアミノ酸配列は高い同一性を有する。従って、あるHAの亜型に属する1種のインフルエンザウイルスのHAタンパク質を抗原とした免疫により、同じHAの亜型に属する異なるNAの亜型の株に対する免疫もある程度獲得できる可能性が高い。

【0034】センダイウイルスベクターからウイルスの複合体が再構成する限り、再構成に用いるベクター製造用の宿主細胞は特に制限されない。例えばサル腎由来のCV1細胞やLLCM2細胞、ハムスター腎由来のBHK細胞などの培養細胞を使って、センダイウイルスの複合体を再構成することができる。しかし大量に複合体を得るには、得られた複合体を、発育鶏卵を使って増幅することが好ましい。実施例に示すように、強毒型インフルエンザウイルスタンパク質を発現する本発明の組換えセンダイウイルスは毒性が低く、有意な細胞障害性を示さない。従って、強毒型インフルエンザウイルスそのものを使う場合と異なり、鶏卵を使ってインフルエンザワクチンを大量に製造することが可能である。鶏卵を使ったベクターの製造方法は既に開発されている（中西ら編, (1993), 「神経科学研究の先端技術プロトコールIII, 分子神経細胞生理学」, 厚生社, 大阪, pp. 153-172）。具体的には、例えば、受精卵を培養器にいれ9～12日間 37～38℃で培養し、胚を成長させる。センダイウイルスベクターを漿尿膜腔へ接種し、数日間卵を培養してウイルスベクターを増殖させる。培養期間等の条件は、使用する組換えセンダイウイルスにより変わり得る。その後、ウイルスを含んだ漿尿液を回収する。また、漿尿液からのセンダイウイルスの分離・精製は常法に従って行うことができる（田代真人, 「ウイルス実験プロトコール」, 永井、石浜監修, メジカルビュー社, pp. 68-73, (1995)）。

【0035】回収されたセンダイウイルスベクターは、生ワクチンとして使うことができる。本発明において生ワクチンとは、センダイウイルスベクターが、投与された個体の中で増殖し、免疫を獲得させるものを言う。実施例に示すように、本発明のセンダイウイルスベクターを用いた強毒型インフルエンザワクチンは細胞障害性が低いため、生ワクチンとして好適に用いられる。このような生ワクチンを接種する対象に制限はなく、ヒト、トリ、ブタ、ウマ、ウシ等インフルエンザウイルスが感染しうるあらゆる動物が含まれる。インフルエンザウイルスは、ブタやトリ等の非ヒト動物からヒトへの感染の可能性があることから、非ヒト動物に対して本発明のワクチンを使用することも有効である。また、前述の伝播力が欠損したセンダイウイルスベクターを用いれば、生ワクチンであってもベクターが伝播しないワクチンを製造することができる。

【0036】回収されたセンダイウイルスは、また、不活化した全粒子ワクチンとしても使用できる。不活化と

は、ウイルス本来の機能が失われ、正常な増殖が起これなくなることを言う。これにより、ワクチン接種した個体内でのウイルスの増殖のリスクを回避できる。不活化させる方法は特に制限はないが、UV照射、ホルマリン処理等が挙げられる。

【0037】また、センダイウイルスベクターを断片化させて、全粒子ワクチンよりもアレルギー性をより低下させ許容度を高めることもできる。断片化の方法は特に制限されないが、エーテルやクロロホルム等の溶剤および/またはイオン系、非イオン系界面活性剤による処理が挙げられる。

【0038】またセンダイウイルスベクターから、発現させたインフルエンザウイルスタンパク質を分離・精製してワクチンとすることもできる。センダイウイルスベクターには、限られた種類のタンパク質しか含まれないため、例えば発現ベクター等を用いて細胞内で発現させたインフルエンザウイルスタンパク質を細胞全抽出物から分離するのに比べ、格段に精製が容易である。タンパク質の精製には周知の分離技術を使用することができ、例えば、インフルエンザH5タンパク質に対する抗体を用いて、実施例8に記載したようなイムノアフィニティークラムにより精製することも可能である。精製タンパク質をワクチンとして使うことで、生ワクチンや不活化ワクチンに比べ接種後の発熱や局所反応が起きる頻度が抑えられることが期待できる。

【0039】本発明によって得ることができる病原体のタンパク質には、そのタンパク質が由来する天然の病原体のタンパク質よりも強い抗原活性が期待できる。すなわち、実施例においてHIVのenv抗原タンパク質gp120で確認されたように、本発明にしたがってセンダイウイルスベクターを発現ベクターとして用いた場合、その発現生成物は天然のgp120のエピトープを構成する合成ペプチドよりも抗体との反応性が向上する現象が確認されている。インフルエンザウイルス抗原において、細胞障害活性を低く抑えながら強い免疫刺激を達成することができたのも、センダイウイルスベクターの利用によって抗原性が強化されたことが原因の一つとして推測される。本発明によって得ることができる病原体タンパク質が抗原活性を強化する機作は明らかでない。しかし同じ遺伝子を利用している以上アミノ酸配列には変異は生じないはずなので、抗原性の強化は糖鎖構造の変化や、タンパク質の立体構造の違いによってもたらされている可能性が有る。

【0040】いずれにせよ本発明によって得ることができる病原体のタンパク質は、免疫原タンパク質として、あるいは抗体を検出するための免疫分析用タンパク質として有用である。本発明によるタンパク質を免疫原に用いた場合には、免疫原性の向上によって安全性と有効性に優れたワクチンの原料として期待できる。

【0041】ワクチンは必要に応じて、薬理学上許容さ

れる担体または媒体（生理食塩水、植物油、懸濁剤、界面活性剤、安定剤など）を含んでよい。また保存剤やその他の添加剤を添加することができる。また、免疫原性を高めるために、サイトカイン、コレラ毒素、サルモネラ毒素等の免疫促進剤を添加することもできる。

【0042】ワクチンの接種は、経皮的、鼻腔内の、経気管支的、筋内的、静脈内、または経口的に行われうる。投与量は、ワクチンの形態や投与方法などにより変動し得るが、当業者であれば適宜適当な投与量を選択することができる。インフルエンザウイルスは上気道の細胞で増殖すると発熱などの症状を直ちに誘発するので、この周辺すなわち鼻腔内粘膜や上気道においてワクチン接種により作られた局所抗体が働くことが好ましい。例えば皮下注射によるワクチンの接種では血液中に多量の抗体ができるが、鼻腔内粘膜や上気道に滲出する抗体の量が少ないため、肺炎などの重症化防止には有効でも、初期症状に対する効果が薄れると考えられる。そのため、インフルエンザワクチンを鼻内噴霧等により気道へ接種することが有効と考えられる。

【0043】また、特に新型インフルエンザに対しては基礎免疫を持たないと考えられるため、ワクチンの2回接種により十分な免疫を得ることが有効であると考えられる。ヒトの場合、2回の接種の間隔は通常2～4週間である。

【0044】ワクチン接種が可能な動物としては、免疫系を有し、かつインフルエンザウイルスに感染するあらゆる宿主が挙げられ、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ、ウマ、サル、トリなどが含まれる。

【0045】また本発明による病原体のタンパク質を抗体検出用の抗原に用いれば、より特異的で高感度な免疫分析系を構成することができる。本発明において病原体のタンパク質としては、たとえばウイルスの糖タンパク抗原等を示すことができる。ウイルスの糖タンパク質には、インフルエンザウイルスのHA抗原やHIVのエンベロープタンパク質gp120等の、免疫分析用抗原として重要なものも多く含まれる。本発明によるタンパク質を用いて病原体タンパク質に対する抗体を測定することができる。病原体に対する抗体は、その病原体の感染経路を示す重要な臨床的指標である。本発明によるタンパク質は、公知の免疫学的分析手法に適用することができる。中でも、酵素標識を利用したELISAに代表される手法は、安価に高感度な分析系を確立することができるので望ましい。ELISAによる抗体の分析は、抗原を感作した固相に試料を接触させ、抗原に結合する抗体を酵素標識した抗IgG抗体で検出する手法が一般的である。あるいは、プロテインAなどを利用して試料中の全てのIgGを捕捉した後に、酵素標識した抗原で病原体に対する抗体のみを検出することもできる。ELISAに必要な固相抗原や酵素標識抗体は予め組み合わせキットとして供給することができる。

【0046】

【実施例】以下実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0047】【実施例1】 トリインフルエンザウイルスのマウス順化株の作製

マウスで継代可能で、病原性を示すウイルスを得るため、鶏卵から分離されたトリインフルエンザウイルス A/whistling swan/Shimane/499/83(H5N3) 株をマウス経鼻接種で継代した。マウス継代3代目まではその時点における最大ウイルス量を接種し、感染1～3日目以最も高い感染価を示したマウスの肺のホモジェネートを次代へと継代した。ウイルスは、卵継代株を「M-0」、マウス継代1～5代目をそれぞれ「M-1」～「M-5」と名付けた。

【0048】マウス継代に伴ってウイルスは速やかにマウスに順化してよく増殖するようになり、病原性も強くなり、その条件では死亡するマウスも観察された。即ち、マウス継代に伴いウイルスの増殖能は上昇し、肺病変も強くなった。そこで、4代目以降はウイルス接種量を  $1 \times 10^4$  CIU/マウスとした。4代目以降はウイルスのタイターはプラトーに達した。そのときの肺内ウイルス増殖の時間経過、マウスの体重変化、および、肺の肉眼病変を図1に示した。

【0049】肺内ウイルスの増殖は、肺をPBS中ですりつぶして得たホモジェネートの10%中に含まれるウイルス力価で表した。また、肺の肉眼病変は、肺全体に対す\*

\* 充血領域の割合を測定し、<25%ならば 1、25～50%ならば 2、50～75%ならば 3、>75%ならば 4、死亡した場合は 5とした (A. Kato et al., EMBO J. 16: 578-587 (1997))。

【0050】M-0、M-3、M-5の3株について、それぞれ  $1 \times 10^4$  CIU/マウスで経鼻接種し、体重変化、肺の肉眼病変、および肺内ウイルス増殖の時間経過を測定した。その結果を図2に示す。いずれの株も肺内ウイルス増殖は急速で、感染1～2日目に最大になり、以降徐々に減少するパターンを示した。しかし、M-0はマウス継代株に比して明らかに肺内ウイルスの増殖の程度は弱く、肺の病変も軽症で、体重の減少も殆ど見られず、死亡するマウスも見られなかった。M-3とM-5の間にはウイルス増殖には大きな違いは見られなかったが、肺の病変と体重減少の程度はM-5の方が強かった。

【0051】次にマウスでの継代に伴うマウス病原性の変化を調べるため、M-0、M-3、M-5の3株についてマウスに対する  $LD_{50}$  を測定した。その結果を表1に示す。表中の「死亡マウス/接種マウス」は感染13日目の死亡率で示した。M-0は、 $4 \times 10^6$  CIU 接種において全くマウスを殺さなかったため、便宜的に  $LD_{50} \Rightarrow 1.26 \times 10^7$  CIU/マウスとした。一方、マウス継代株はいずれも強い病原性を示し、M-3およびM-5の  $LD_{50}$  はそれぞれ <31.6 CIU/マウスおよび 12.6 CIU/マウスと計算された。

【0052】

【表1】

ウイルス	接種量 (CIU/マウス)	死亡マウス /接種マウス	$LD_{50}$ (CIU/マウス)
M-0	$4 \times 10^6$	0/5	$\Rightarrow 1.26 \times 10^7$
M-3	$1 \times 10^5$	5/5	<31.6
	$1 \times 10^4$	5/5	
	$1 \times 10^3$	5/5	
	$1 \times 10^2$	5/5	
M-5	$1 \times 10^4$	5/5	12.6
	$1 \times 10^3$	5/5	
	$1 \times 10^2$	5/5	
	$1 \times 10^1$	2/5	
非感染	(-)	0/5	

【0053】即ち、トリインフルエンザウイルス A/whistling swan/Shimane/499/83(H5N3)株はマウス肺で継代することにより、速やかにマウスの肺で増殖するようになり、マウスに対する病原性も急速に強くなり、5代継代で  $LD_{50}$  は100万分の1になった。なお、M-3について

は、 $10^7$  CIU で全マウスを殺してしまったために、便宜的に  $LD_{50}$  < 31.6 CIU としたが、M-5と同様の病原性を示す可能性がある。

【0054】【実施例2】 組換えセンダイウイルスベクターの作製



インフルエンザウイルス株 (A/turkey/Ireland/1378/83 (H5N8)) (Kawaoka Y. et al., Virology, 1987, 158: 218-227) から、文献「Kawaoka Y. et al., Virology, 1987, 158:218-227」に従って鋳型DNAを調製した。プライマーHKH5-F (5'-aag ccg ccg ctc tgt caa aat gga g aa aat-3') (配列番号: 1) 及びプライマーHKH5-R (5'-aag ccg ccg cga tga act ttc acc cta agt ttt t ct tac tacgac gta cgt taa atg caa att ctg cat t-3') (配列番号: 2) を用い、「NT/60/5/4」(J.A. Huddleston and G.G. Brownlee, 1982, Nucleic Acids Res. 10: 1029-1038) 上のHA遺伝子を標準的なPCR法により増幅した。増幅断片の塩基配列を配列番号: 3 に示す。増幅断片をNotIで消化し、1758塩基の断片をNotIで消化したpSeV(+)/18bV(-) (実験医学 Vol.15 No.19(増刊)1997; Kato A., et al., ENBO J. 16:578-587 (1997) に挿入した(図3)。次いで、これを大腸菌に形質転換し大腸菌の各コロニーのDNAを「Miniprep」法で抽出し、期待される大きさのDNA断片を含んでいることが確認されたクローンを選抜することで、目的のプラスミドを得た。得られたプラスミドを塩化セシウム密度勾配遠心により精製した。

【0055】このプラスミドおよび挿入のない対照プラスミドを、公知の方法に従い、LLCM2細胞に導入しセンドライウイルス粒子を再構成させ、産生された組換えセンドライウイルス粒子を、さらに鶏卵に接種して増幅させた(国際公開97/16539号および国際公開97/16538号参照)。回収したウイルス粒子はPBSに希釈し、ウイルス力価を測定したところ、 $3 \times 10^8$  CIU(平均値)であった。

【0056】組換えウイルス(「SeV/tukH5」と称する)および親株のセンドライウイルス(「SeV/V(-)」と称する)を感染させたLLCM2細胞およびCV-1細胞は、細胞観察の結果、各々の細胞形態に大きな違いがないことから、亜型H5 HAの発現による細胞障害性は認められなかった。

【0057】[実施例3] 抗H5抗血清を用いた免疫化学的解析

3-1) インフルエンザウイルス亜型H5抗血清の作製  
 発育鶏卵で増殖させたA/Tern/South Africa/61 (H5N3) 株を、マウスのL細胞に感染させ、感染後1日目細胞を取り、この細胞をPBSと混ぜて10%乳剤とし、ホルマリンで不活化後に、マウスの皮下に接種して常法に従いマウス抗H5<Tern/South Africa>抗血清を作製した。

【0058】また、発育鶏卵で増殖させたA/Tern/South Africa/61(H5N3)株を、超遠心(30,000rpm, 90分)で沈殿させ、これを抗原として常法に従いニワトリに免疫し、ニワトリ抗H5<Tern/South Africa>抗血清を作製した。

【0059】3-2) 間接蛍光抗体法による解析  
 チェンバースライドガラスの上にCV1細胞モノレイヤー

を作った。それに、moi1で親株であるSeV/V(-) (挿入を持たない対照) あるいはSeV/tukH5を感染させた。感染後、血清無しの培地で一晚培養した。培養液を除いた後、PBSで一度細胞を洗った。0.5%ホルマリン/PBSで室温5分で、細胞を固定した。PBSで一度洗浄後、0.2% NP-40を含んだPBS溶液を加えて、室温5分で細胞膜の透化処理を行った。次に0.1 mlの200倍希釈したマウス抗インフルエンザウイルスA/Tern/SAを、室温で1時間処理した。その後、PBSで5回洗浄し、最後に抗マウスIg(H+L)にFITCを結合させた抗体(市販品 Cappel社製)を100倍希釈で0.1 mlを室温で1時間作用させた。その後、PBSで5回洗浄後、80%グリセリン/PBSと共にカバーガラスをかけ、検鏡した。その結果、SeV/tukH5感染細胞特異的に細胞の蛍光像が観察された(図4)。

【0060】3-3) 感染細胞のウェスタンブロット解析

BHK細胞を6穴の組織培養プレートにモノレイヤーになるように培養した。次に、この細胞にmoi 10でSeV/V(-) あるいはSeV/tukH5を感染させた。約24時間後に、細胞をラバーポリスマンでかきとり、6,000rpm 5分遠心して細胞を沈澱として回収した。この沈澱物に0.1 mlのPBSと同じく0.1 mlの2xSDSサンプルバッファーを加えて溶解し、90℃で5分加熱してから、SDS-PAGEにかけた。

【0061】ゲルの濃度は12.5%で、泳動後はPVDF膜にセミドライ法で電気泳動的にブロッティングした。転写後は、一部はそのまま、転写膜をクマシーブリリアントブルー(CBB)で染色し、残りは3%のスキムミルクで室温1時間のブロッキング処理後に、500倍に希釈したマウス抗H5抗血清と混ぜて、さらに1時間、室温で反応させた。その後、抗血清を抜き取り、20mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1 % Tween 20からなる洗浄液で4回洗った。洗った後に、パーオキシダーゼ標識した抗マウスIgG (市販品Cappel社製)を250倍に希釈して加え、同様に1時間、室温で作用させた。最後に再び、洗浄液で4回洗った後、コニカイムノステインキットの方法に従って、発色させた。

【0062】その結果、組換えセンドライウイルスを感染させたBHK細胞では、トリブシン非存在下にも関わらず、インフルエンザのHAタンパク質は、HA0がHA1およびHA2に開裂していることが示された(図5)。

【0063】3-4) 精製センドライウイルス粒子の解析  
 SeV/V(-)またはSeV/tukH5を接種した発育鶏卵のしょう尿液を3日目に回収した。その液を集めて、冷却高速遠心機で9,000rpm, 15分遠心して、血球や細胞成分を落とした。その上清を集めて、今度は超遠心(30,000rpm, 90分)にかけて、ウイルスを今度は沈澱として回収した。この沈澱に数mlのPBSを加え、超音波破砕機を使って、完全に懸濁させた。この懸濁液を60%と20%の2層からなる蔗糖の最上部に静かに乗せ、27,000rpmで90分間、密度勾配遠心にかけた。遠心終了後、20%と60%の層の間に

来たウイルス液を回収した。

【0064】こうして回収した精製ウイルス粒子をSDS-PAGEにかけ、インフルエンザウイルスに対するマウス抗H5抗血清を使ってウエスタンブロッティングを行った。その結果、SeV/tukH5では精製ウイルス粒子中のインフルエンザウイルスのHAタンパク質はHA1およびHA2に開裂していることが、クマシー染色、そして、イムノブロットの結果観察された(図6)。そのため、インフルエンザウイルスHAの一部はSeV粒子中に取り込まれると結論された。

【0065】また、この精製SeV/tukH5ウイルス粒子、および、対照として同様に精製したSeVを抗原として、常法に従いニワトリに免疫し、それぞれ抗SeV/tukH5抗血清および抗SeV抗血清を作製した。得られた抗SeV/tukH5抗血清が亜型H5のインフルエンザウイルスと反応するかどうかを確かめるために、インフルエンザウイルス(A/whistling swan/Shimane/499/83(H5N3)株)を抗原としてイムノブロットを行った。その結果、SeV/tukH5ウイルス粒子に対して作られた抗血清が、亜型H5のHA分子に対して反応性を有することが確認された(図7)。このことから、インフルエンザウイルスHAはSeV粒子中に取り込まれることが証明された。

#### 【0066】[実施例4] 免疫電顕による解析

SeV/tukH5ウイルス粒子において、H5タンパク質がセンダイウイルスの表面に局在しているかを調べるため、免疫電顕による解析を行った。SeV/tukH5を接種した発育鶏卵のしょう尿液を遠心(28,000rpm、30分)にかけてSeV/tukH5ウイルス粒子を集め、蒸留水に懸濁した。このウイルス懸濁液(1×10<sup>8</sup> 粒子/ml) 5μlを支持膜付きのマイクログリッド上に滴下し乾燥させた。0.1%BSAを含むPBSで30分間前処理を行い、その後前処理液をろ紙で吸い取り、0.1%BSAを含むPBSで200倍に希釈したマウス抗H5抗血清をグリッドに滴下し、保湿状態で60分間反応させた。PBSで6回洗浄した後、余分の水分をろ紙で吸い取り、0.1%BSAを含むPBSで20倍希釈した金コロイド標識抗マウスIgG(ISN社)をグリッドに滴下し、保湿状態で60分間反応させた。PBSで6回洗浄した後、さらに蒸留水で2回リンスし、風乾させた。4%酢酸ウラニウムで3分間染色し、風乾させた。電子顕微鏡 JEM-1200EXII(日本電子)にて観察、撮影した(図8)。

【0067】その結果、金コロイドはセンダイウイルス粒子の表面に観察されたことから、SeV/tukH5ウイルス粒子において、H5タンパク質はウイルス粒子の表面に発現していることが示された。

#### 【0068】[実施例5] 組換えセンダイウイルスによ

#### \* マウスの免疫

5-1) マウスをエーテルで軽く麻酔し、希釈した組換えセンダイウイルスベクター(野生株、SeV/V(-)株、およびSeV(-)/tuk-H5)(1×10<sup>7</sup> CIU/25μL)を、マウスに経鼻接種により免疫した。マウスはICR/Crj(CD-1)株、3週齢の雄(8~10g)を用いた。センダイウイルスを接種後、0、1、3、5、7、9日目に肺内ウイルスを測定した。また、0、5、7、10、14、28日後には、血清中の抗体産生を測定した。また、感染後0、1、および3日後には脾臓、肝臓および血液中からのウイルス分離も試みた。血液はヘパリン血を用いた。採血にあたっては、マウスをエーテルで軽く麻酔後鼠後部皮膚を小切開し、大腿動脈をハサミで切り、出血してきた血液をキャピラリービペットで採血した。なお、ヘパリン血採取にあたっては、あらかじめエッペンドルフチューブ内にヘパリン20μlを入れておき、マイクロビペットで180μlの血液を採取して混和した。

【0069】抗SeV ELISA IgG 抗体価(抗センダイウイルス ELISA IgG 抗体価)の測定には、HVJ浜松株の精製ウイルス粒子を抗原とし、抗H5 ELISA IgG 抗体価の測定には、A/whistling swan/Shimane/499/83(H5N3)の精製ウイルス粒子を抗原としてELISA法にて測定した(表2)。

【0070】5-2) センダイウイルスベクターなしのワクチン(偽接種)、センダイウイルス野生株(10<sup>7</sup> CIU)、挿入を持たない組換えセンダイウイルス(SeV/V(-))(10<sup>7</sup> CIU)(A. Kato et al., EMBO J. 16: 578-587 (1997))、およびSeV(-)/tuk-H5(10<sup>7</sup> CIU)をそれぞれマウスに経鼻接種したときの、マウスの体重変化、肺の肉眼病変、および肺内ウイルス増殖の測定結果を図9に示す。観察期間を通して顕著な体重変化は認められなかった。SeV(-)/tuk-H5感染マウスは感染後1日目までは10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>のオーダーのウイルス増殖を示したが、2日目以降急速に肺から排除され、7日目以降は完全に検出されなくなった。肺の肉眼病変もそれほど重症化することはなかった。また、肺以外の臓器や血液からのウイルスの分離は全例陰性であった。

【0071】5-3) 免疫マウスの抗体産生の時間的経過を表2に示す。SeV(-)/tuk-H5感染の経過に伴って、センダイウイルスおよびH5タンパク質に対する抗体価(それぞれ表中の「抗HVJ」および「抗H5」の欄)は上昇した。測定したマウス全てにおいて、両ウイルス抗原に対する抗体応答が確認された。

#### 【0072】

【表2】

感染後の 日数	マウスの 番号	SeV/V(-) ELISA-IgG抗体価		SeV(-)/tuk-H5 ELISA-IgG抗体価	
		抗HVJ	抗H5	抗HVJ	抗H5

19				20	
0	1	10	<10	<10	<10
	2	10	<10	<10	<10
	3	10	<10	<10	<10
5	1	400	<10	20	<10
	2	800	<10	10	<10
	3	400	<10	<10	<10
7	1	2,000	<10	800	200
	2	2,000	<10	800	20
	3	1,000	<10	800	40
9	1	800	<10	1,000	10
	2	4,000	<10	800	100
	3	4,000	<10	800	40
14	1	20,000	<10	8,000	800
	2	20,000	<10	10,000	4,000
	3	10,000	<10	4,000	400
21	1	20,000	<10	ND	ND
	2	20,000	<10	ND	ND
28	1	80,000	<10	80,000	1,000
	2	20,000	<10	80,000	2,000
陽性対照-1(抗-HVJ抗血清)				8,000	<10
陽性対照-2(抗-H5抗血清)				<10	20,000
陰性対照(正常血清)				<10	<10

【0073】[実施例6] 組換えセンダイウイルスによる免疫マウスのインフルエンザウイルスのチャレンジに対する防御能の測定

マウス(ICR/Crj(CD-1)株、3週齢の雄(8~10g))をエーテルで軽く麻酔し、希釈した組換えセンダイウイルスベクター(SeV(-)/tuk-H5) ( $3 \times 10^7$  CIU/25 $\mu$ L)を、マウスに経鼻接種により免疫した。マウスは毎日体重を測定した。センダイウイルスを接種後、2週間目に採血し、血清中の抗体産生を測定した。半数のマウスは、組換えセンダイウイルスベクター(SeV(-)/tuk-H5) ( $5 \times 10^7$  CIU/マウス)を経鼻接種してブースターし、残り半分のマウスはそのまま飼育した。ブースター2週目に、実施例1においてマウスに順化させたトリインフルエンザウイルス由来株(M-5)  $1 \times 10^4$  CIUを経鼻でチャレンジ(感染)し、0、1、2、3、および5日後の肺内ウイルス増殖を測定した。

【0074】抗SeV ELISA IgG 抗体価の測定には、HVJ 浜松株の精製ウイルス粒子を抗原とし、抗 H5 ELISA IgG 抗体価の測定には、A/whistling swan/Shimane/499/8

3(H5N3)の精製ウイルス粒子を抗原として ELISA 法にて測定した。

【0075】センダイウイルス接種後の体重変化を図10に、インフルエンザウイルスのチャレンジ後の体重変化、肺の肉眼病変および肺内ウイルス増殖の時間経過を図11に示す。

【0076】実施例5と同様に、センダイウイルスワクチン接種によって、インフルエンザウイルスのチャレンジまでの観察期間を通して体重変化に顕著な影響は認められなかった(図10)。また、ブースターによる体重増加への影響も見られなかった。

【0077】インフルエンザウイルスのチャレンジに対する防御効果については、非免疫マウスでは、チャレンジ1日目に  $10^7$  CIU のウイルスが検出され、2日目にはさらに増殖し、3日目以降は減少し、5日目には  $10^{5.5}$  前後となった。これに応じて2日目から体重の減少が見られ、3日目から肺の肉眼病変も出現し、4日目には1匹のマウスが死亡した。

【0078】これに対し免疫マウス(非ブースター)で

21

はチャレンジ1日目の肺内ウイルス量は非免疫マウスのそれとほとんど同じレベルであったが、二日目には既に減少する傾向が見られた。体重減少は3匹中1匹において認められたが、非免疫マウスのそれと比して明らかにその程度は弱く、肺病変も5日目になって出現したが、死亡するマウスは見られなかった。ブースターを施した免疫マウスでは、チャレンジ1日目にはほぼ完全にウイルス増殖を抑制した。2日目以降ウイルスの増殖を許すが、その程度は非免疫マウスのその 1/10 前後であつた。

22

＊た。体重減少も認められず、肺の病変もきわめて軽微なものであった。

【0079】抗 SeV 抗体および抗 H5 抗体の産生（それぞれ表中の「抗 HVJ」および「抗 H5」の欄）の時間経過を肺の肉眼病変およびインフルエンザウイルス増殖の時間経過と共に表3に示した。

【0080】

【表3】

日数	マウスの 番号	ELISA-IgG抗体価		肺の 肉眼病変	ウイルス (CIU/ml)
		抗 HVJ	抗 H5		
免疫2週目 (ブースター前)		-1	20,000	4,000	
		-2	20,000	40	
		-3	20,000	4,000	
		-4	20,000	20	
		-5	20,000	1,000	
		-6	10,000	2,000	
免疫4週目 (ブースター 2週後、 チャレンジ前)	非免疫	-1	ND		
		-2	ND		
		-3	ND		
	ブースター(-)	-1	40,000	400	0
		-2	40,000	8,000	0
		-3	40,000	1,000	0
	ブースター(+)	-1	160,000	4,000	0
		-2	80,000	8,000	0
		-3	80,000	1,000	0
チャレンジ 1日目	非免疫	-1	<10	<10	0
		-2	<10	<10	0
		-3	<10	<10	0
	ブースター(-)	-1	100,000	2,000	0
		-2	100,000	2,000	0
		-3	200,000	2,000	0
	ブースター(+)	-1	200,000	2,000	0
		-2	400,000	4,000	0
		-3	200,000	8,000	0
チャレンジ 2日目	非免疫	-1	<10	<10	0
		-2	<10	<10	0
		-3	<10	<10	0

23

						24
	ブースター(-)	-1	100,000	200	0	$2.13 \times 10^5$
		-2	100,000	100	0	$1.98 \times 10^5$
		-3	400,000	800	0	$1.38 \times 10^5$
	ブースター(+)	-1	200,000	2,000	0	$4.99 \times 10^5$
		-2	200,000	8,000	0	$5.68 \times 10^5$
		-3	100,000	2,000	0	$3.91 \times 10^5$
チャレンジ 3日目	非免疫	-1	<10	<10	0	$1.82 \times 10^5$
		-2	<10	<10	0	$8.26 \times 10^5$
		-3	<10	<10	1	$1.58 \times 10^5$
	ブースター(-)	-1	160,000	2,000	0	$2.75 \times 10^5$
		-2	160,000	2,000	0	$3.80 \times 10^5$
		-3	160,000	2,000	0	$5.44 \times 10^5$
	ブースター(+)	-1	80,000	200	0	$2.48 \times 10^5$
		-2	40,000	1,000	1	$3.29 \times 10^5$
		-3	80,000	8,000	1	$2.48 \times 10^5$
チャレンジ 5日目	非免疫	-1	<10	<10	0	$1.57 \times 10^5$
		-2	<10	<10	5	$4.03 \times 10^5$
		-3	<10	<10	3	$3.80 \times 10^5$
	ブースター(-)	-1	80,000	8,000	3	$1.98 \times 10^5$
		-2	80,000	8,000	2	$2.06 \times 10^5$
		-3	80,000	200	1	$6.73 \times 10^5$
	ブースター(+)	-1	160,000	2,000	1	$5.68 \times 10^5$
		-2	40,000	200	0	$2.99 \times 10^5$
		-3	80,000	2,000	0	$4.62 \times 10^5$

【0081】[実施例7] HIV-1 亜型E gp120遺伝子を持つ組換えセンダイウイルスの構築

#### 7-1) プラスミド構築

次にヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)のエンベロープタンパク質遺伝子(env)を発現するSeVベクターの構築を行った。SeV発現プラスミドの構築に使用したHIV-1亜型E gp120 遺伝子は、日本で同定されたHIV-1 亜型EのR5株であるNH2(HIV-1<sub>NH2</sub>)由来のenv遺伝子全長を含むpNH 2a-1より単離した(Sato, H. et al., 1997, AIDS 11: 396-397)。SeVをベースとしたHIV-1 亜型E gp120の発現プラスミドは文献「Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587, Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466」と同様にして作製した(図12)。簡単に、HIV-1 亜型E env gp120 遺伝子(1,515 bp)を、NotI タグを付加したプライマー対NH2SU501A [5'-AAGcgcgcgc AAGACAGTGGAAATGAGAGTGAAGGAGACACAGATG-3'/配列番号: 4(センス鎖)]および NH2SU502B [5'-TTgcgcgcgcGATGA ACTTTCACCCCTAAGTCTTTCTTACTACGCGTACGtcaTCTTTTTTCTCT 50

CTCC-3'/配列番号: 5(アンチセンス鎖)]を用いてポリメラーゼ連鎖反応(PCR)により増幅した。配列中の下線のない小文字はNotI認識部位を表す。下線のある大文字は、保存された介在配列である 3'-GAA-5' を介して連結された SeVの新しいSおよびEシグナルを表す。下線のある小文字は gp120 遺伝子のオープンリーディングフレームの直後に挿入したストップコドンを表す。E(終結)およびS(開始)シグナルは、それぞれ、挿入したgp120遺伝子の転写を終結させ、下流にあるN遺伝子の転写を開始させる機能を有している(図12)。gp120遺伝子の発現はSeVベクターのN遺伝子のSシグナルにより開始されるように設計した。PCRはExTaqポリメラーゼ(Takara Shuzo Co., Japan)を用いて行い、増幅した断片はNotI切断の後、pSeV(+18bV(-)(Kato, A. et al., 1997, EMBO J. 16: 578-587)のNotI部位に直接挿入し、gp120が組込まれたセンダイウイルスベクターpSeV/gp120-Eを得た。HIV-1 亜型B(pNL432)のenvgp120を持つpSeVをベースとした発現プラスミド(Yu, D. et a

1., 1997, Genes Cells 2: 457-466) は、pSeV/qp120-Bと名付け、実験に用いた。

【0082】7-2) HIV-1 qp120s を発現する組換えセンダイウイルスの再構築

組換えセンダイウイルス(SeV)のストックは、文献(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)に従い調製し、ウイルス力価を決定した。簡単には、直径60 mmのプラスチックプレート上で、10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンGおよび100 μg/ml ストレプトマイシン)を含む最少必須培地(MEM)を用いてサル腎臓由来細胞株LLQMK2を70~80%コンフルエント(2×10<sup>6</sup> 細胞)になるまで培養し、T7ポリメラーゼを発現する組換えワクシニアウイルス vTF7-3 (Fuerst, T.R. et al., 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 8122-8126, Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)を2 PFU/細胞で感染させた。感染1時間後、60 μgのpSeV/qp120-Eを、全長センダイウイルスゲノムの生成に必須なトランスに作用するウイルスタンパク質を発現するプラスミド(24 μgのpGEM-N, 12 μgのpGEM-P, および24 μgのpGEM-L) (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)と共にリポフェクション法(DOTAP, Boehringer-Mannheim, USA)によりトランスフェクションした。トランスフェクションを行った細胞は、40 μg/mlのシトシンアラビノシド(araC) (Sigma, USA) および100 μg/mlのリファンピシン (Sigma, USA) を含む血清不含のMEMで培養し、ワクシニアウイルスによる細胞毒性を最少にとどめ、ウイルスの回収率を最大にするようにした(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)。トランスフェクションから48時間後、細胞を回収し、凍結融解を3回繰り返して細胞を破碎した後、10日齢の発育鶏卵のしょう尿膜内へ接種した。3日後、しょう尿液を回収し、ウイルス力価を決定した。回収されたセンダイウイルスの力価は10<sup>6</sup> ~ 10<sup>9</sup> PFU/mlであり、共に含まれていたワクシニアウイルス vTF7-3は10<sup>3</sup> ~ 10<sup>4</sup> PFU/mlであった。10<sup>-6</sup> に希釈し鶏卵で増幅させ、ワクシニアウイルスを除去した。この2回目の継代で得られた組換えウイルスをストックし、それぞれSeV/qp120-EまたはSeV/qp120-Bと名付け、以後の実験に使用した。ウイルスストックのブランク形成能はLLQMK2細胞に感染させて決定し、赤血球凝集活性(HA)は「endo-point 希釈法」(Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1: 569-579)により決定した。鶏卵で2回継代を行った組換えウイルスのウイルスストックは、一般的に10<sup>9</sup> PFU/mlまたは10,240 HA unit/mlの力価を有していた。

【0083】[実施例8] HIV-1 亜型Eの組換えqp120の発現

組換えqp120の発現および調製のため、サル腎臓細胞株CV-1 細胞を10%ウシ胎児血清(FCS)および抗生物質(100 units/ml ペニシリンG および100 μg/ml ストレプト

マイシン)を含む最少必須培地(MEM)で培養した。組換えセンダイウイルス(pSeV/qp120-BまたはpSeV/qp120-E)を10 PFU/細胞で37°C1時間感染させ、1回PBSで洗浄後、血清を含まないDMEMで培養した(Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。さまざまな時間に培養上清を回収し、HIV-1 亜型BまたはEのどちらかに感染した患者の血清から10血清をブールしたものをを用いてqp120生産レベルをウェスタンブロットにより解析した。すなわち培養上清を3容量のエタノールと混合し、-80°Cで1時間冷却後、12,000gで30分間遠心して沈殿を等量の2%SDS含有PAGE用サンプルバッファー(Daiichi Pure Chemical Co., Japan)に溶解させた。試料をSDS-PAGEにかけ、膜へ電気泳動的に転写してHIV-1 亜型EまたはBに感染した患者の血清ブールを500倍に希釈してインキュベートし、<sup>125</sup>IラベルしたプロテインA(NEX146, Dupont, USA)を加え、BAS2000(Fujix, Japan)を用いてオートラジオグラフィーを行った。qp120の定量には、既知の濃度の亜型Eレファレンスタンパク質(バキュロウイルスベクターにより発現されたCM株由来のHIV-1 亜型E qp120; [National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Research and Reference Reagent Program, USA]より供与。Lot番号 4-96196)を段階希釈して、試料と共にウェスタンブロット解析を行った。

【0084】銀染色には、組換えSeVを感染させたCV-1細胞の培養上清(200 μl)を3容量(600 μl)のエタノールと混合し、-80°Cで1時間冷却後、12,000gで30分間遠心して沈殿を等量の2%SDS含有PAGE用サンプルバッファー(Daiichi Pure Chemical Co., Japan)に溶解させた。5 μlの試料を、SDSを含む4-20%ポリアクリルアミドグラジエントゲルで電気泳動し、キット(BIO-RAD, USA)を用いて銀染色を行った。

【0085】ウェスタンブロット解析の結果、見かけの分子量約110-120 kDaの位置に、HIV-1エンベロープ qp120に対応するバンドが検出された(図13A)。組換えqp120-Eの産生は、感染後24時間で検出され、感染後72時間で最大となった。その動態はpSeV/qp120-Bによる組換えqp120-Bのそれと同様であった(Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)(図13AおよびB)。培養上清において、検出された組換えqp120-Eは、見かけの分子量が約100-120 kDaである主要タンパク質であり、銀染色によるタンパク質像の解析から、全体のタンパク質の約10-20%を占めると考えられた(図13C)。組換えqp120-Eの見かけの分子量に幅があるのは、グリコシレーションの程度やパターンに違いがあるためと思われる。SeVベクター系によりCV-1細胞で産生された組換えqp120-Eは、バキュロウイルス系によりSf-9細胞で発現されたHIV-1 亜型E CM株のqp120(NIH AIDS Reagent Programより供与)に比べ、SDS-PAGEにおける電気泳動の移動度が遅かった。これは哺乳動物細胞と昆虫細胞におけるグリコシレーションの程度やパターンの違いに

起因すると思われる。CV-1細胞の培養上清に分泌された組換えgp120-Eの量は、ウェスタンブロット解析による、CM gp120バキュロウイルス産物の既知の濃度のタンパク質との比較から判断して、6穴プレートの培養では感染後72時間で約2 $\mu$ g/mlに達し（図13A）、50mlボトル培養では、感染後72時間で6 $\mu$ g/mlに達した。それに対して、商業的に入手可能なgp120定量キット（HIV-1 gp120 Antigen Capture Kit (Advanced Biotechnologies, USA)および gp120 Capture ELISA kit (Immuno Diagnostics, Inc. USA)を含む）では組換えgp120-Eを定量することはできなかった。これらのキットはHIV-1 亜型Bのgp120を検出するように設計されており、HIV-1の亜型EとBのgp120の抗原上の相異によるものと思われる。

【0086】次に、HIV-1 亜型EのV3ループに対するモノクローナル抗体(mAb) TQ4B15-2 (Emini, E.A. et al., 1992, Nature 355(6362): 728-730)を結合させたシングルステップアフィニティークラムクロマトグラフィーにより、培養上清から均一な組換えgp120-Eを精製した。SeV/gp120-Eを感染したCV-1細胞の培養上清を、感染72時間後に回収した。5mlのmAb TQ4B15-2を結合させ、PBSで平衡化したイムノアフィニティークラム(Aff i-Gel Hz Immunoaffinity Kit (Bio Rad, USA))に回収した培養上清50mlを通した。カラムは10mlのPBSで2回洗浄し、結合したタンパク質を10mlの0.2M グリシン-HCl バッファー pH4.0で溶出した。タンパク質画分を1M Tris-HCl pH9.5でpH7.4に中和し、-80°Cで保存し実験に使用した。アフィニティークラムでの回収率は約60%であった。精製したタンパク質の銀染色像を図13C(レーンP)に示す。

【0087】[実施例9] 患者血清に対する組換えgp120の血清学的反応性 組換えgp120-Eおよび組換えgp120-Bの抗原上の違いを検証するため、HIV-1 亜型Eに感染した患者の血清プール（7血清）または亜型Bに感染した患者の血清プール（4血清）に対する各タンパク質の反応性をウェスタンブロットで解析した。図14に示したように、亜型E血清および亜型B血清は、それぞれに対応する亜型の組換えgp120と特異的に反応した（図14）。

【0088】[実施例10] 組換えgp120-Eの機能解析 SeV由来の組換えgp120-Eの機能を解析するため、SeV/gp120-Eに感染させたCV-1細胞の粗精製培養上清を用いてCD4に対する結合活性をFACSにより測定した。具体的には、ヒトCD4+ T細胞株 MT4細胞（2 $\times 10^6$ ）を、5 $\mu$ g/mlの組換えgp120-Eと10%FCSを含むMEMで室温で1時間インキュベートした。PBSで洗浄後、細胞に、HIV-1 亜型EのV3-ループに対する上記マウスmAb(TQ4B15-2)を4°Cで45分間反応させた。結合した抗体を、マウスIgGに対するFITC結合ヒツジF(ab')<sub>2</sub>断片 (Pharmaceuticals Inc., USA) で4°C45分間反応させレベルした。FACSscan (Becton Dickinson, USA) を用いて蛍光強度の違いを測定し、平

均蛍光強度を決定した。別の実験では、MT4細胞をさまざまな組換えgp120-Eで、室温で1時間インキュベートし、さらに抗CD4 mAb Leu-3a (Becton Dickinson, USA) で4°C45分間インキュベートした。上記のようにFITC結合F(ab')<sub>2</sub>でラベルし、FACS解析を行った。

【0089】その結果、SeVベクターで発現させた組換えgp120-Eは、CD4を発現するMT4細胞の表面に結合できることが判明した（図15A）。また、gp120の細胞表面への結合と立体的に競合することが知られている抗CD4抗体 (Leu3a) (Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466) の細胞表面への結合が、組換えgp120-Eの用量依存的に阻害された（図15B）。対照実験において、親ウイルスであるSeVを感染させたCV-1細胞の培養上清は、CD4結合活性もLeu3aの結合に対する競合も示さなかった（図15A,B中の"C"）。従って、gp120-Eは天然のgp120と同様、HIV-1の主要な受容体であるCD4を特異的に認識する活性を有していることが示された (Yu, D. et al., 1997, Genes Cells 2: 457-466)。

【0090】[実施例11] EIAの血清学的反応性の解析 SeV由来の組換えgp120の酵素免疫アッセイ(EIA)における血清学的反応性を、V3ループペプチドEIA (Pau, C.P. et al., 1993, AIDS 7: 337-340)と比較しながら検証した。

【0091】HIV-血清陽性の血清を得るため、タイ(n=20)、ベトナム(n=44)、マレーシア(n=3)、カンボジア(n=9)、および日本(n=88)のHIV-1感染患者から、計164のHIV-血清陽性 (seropositive) の血清を集めた。24のHIV陰性の対照血清も、健康な血清陰性 (seronegative) の日本人から採取した。これらの血清について、HIV-1亜型EまたはB gp120に対する抗体を持っているかを、V3-ペプチド酵素免疫アッセイ (EIA)により検定した (Pau, C.P. et al., 1993, AIDS 7: 337-340)。また、HIV-1のエンベロープ C2/V3領域の324塩基の配列を、文献「K usagawa, S. et al., 1998, AIDS Res. Hum. Retroviruses 14: 1379-1385」に従ってPBMCまたは血清からPCRにより増幅し、配列を決定した。env C2/V3領域の塩基配列を用いて最近隣法により系統解析を行い、遺伝的亜型を決定した。東南アジア諸国由来の76の全試料が、HIV-1 亜型Eの感染を受けていることが確認された。日本の全88のHIV陽性血清は、1980年代初頭に北アメリカ由来の血液製剤の輸血により感染した血友病患者に由来する。彼らはHIV-1 亜型Bの感染を受けていた (Hattori, T. et al., 1991, AIDS Res. Hum. Retroviruses 7: 825-830, Komiyama, N. et al., 1989, AIDS Res. Hum. Retroviruses 5: 411-419, Shimizu, N. et al., 1992, J. Mol. Evol. 35: 329-336)。これら164のHIV陽性血清（亜型Eが76血清、亜型Bが88血清）と、21の対照の陰性血清を用いた。

【0092】予備的な実験によれば、SeV由来の組換えgp

p120を濃度15 ng/wellで固定化し、血清を1:8,000希釈する条件が、SeV由来組換えqp120を用いたEIAに最適であった。V3-ペプチドを用いたEIAの場合、HIV-1 亜型EおよびBのV3ループペプチド(14mer)1μg/wellと200倍希釈の血清を用いる条件で行った(Pau, C.P. et al., 1993, AIDS 7: 337-340)。組換えqp120またはV3ループペプチドをマイクロタイターEIAプレート(Immulon II microtiter plate, Dynatech Laboratories, USA)に4°Cで一晩インキュベートして固定化した。5%スキムミルク、0.3%Tween 20を含むPBS(ミルクバッファー)でブロッキング後、0.05% Tween 20を含むPBSで洗浄し、8,000倍希釈の血清[HIV-1 亜型E感染タイ人(n=11)、HIV-1 亜型B感染日本人血友病患者(n=21)、または健康者(n=20)]を含むミルクバッファーで37°C1時間インキュベートし、ウェルに結合した抗体を2,000倍希釈した西洋ワサビパーオキシダーゼ結合ヤギ抗ヒトIgG(Bio-Rad, USA, Catalog番号 172-1001)で37°C1時間インキュベートした。o-フェニルジアミンジヒドロクロライドとH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を含む基質(GENEVA VIA MIX, Sanofi Diagnostic Pasteur, France)を加え、室温で6分発色させた。反応は1N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>を添加して終了させた。492nmの吸光度を測定して反応性を決定した(図16)。

【0093】図中、陰性対照の平均吸光度に標準偏差の7倍の数値を足した値(0.3)をカットオフ値とした(図16A)。図16Bに示したように、SeV系で発現させた組換えqp120-EおよびBを用いたEIA(EIA/SeV)では、亜型特異的抗体が高い特異性を持って検出され(図16B)、結果は遺伝データと100%一致していた。組換えqp120-Eや組換えqp120-Bを用いたEIAは、V3ペプチドEIAに比べはば1,000倍の感度を有していた(図17)。これらは亜型特異的抗体を100%の感度で検出することができた(亜型E試料については76血清中76、亜型B試料については88血清中88)のに対し、HIV-1 亜型EおよびMN株のV3ループペプチドを用いたペプチドEIA(PEIA)の感度は、それぞれに対し90.8%(76中69)、76.1%(88中67)であった。遺伝的にはHIV-1 亜型Eであるものの、HIV-1 亜型EのV3ループペプチドを用いたPEIAでは反応性が見られなかった7つの血清試料に対しても、組換えqp120-Eは例外なく特異的な反応性を示した。同様に、MN \*

\*株のV3ループペプチドを用いたPEIAでは反応性を示さなかったが、組換えqp120-Bとは血清学的反応を示した21の血清試料は、遺伝的にもHIV-1 亜型Bであることが確認された。

【0094】SeV由来組換えqp120の血清学的反応性を、違った血清パネルを用いてさらに検証した。血清パネルは、WHOパネルG(n=8)、および「UNAIDS Network for HIV isolation and characterization」を通して収集した20の血清(Dr. Osmanov, WHO, スイス, Dr. Harvey Holmes, NISHC, およびDr. Johnathan Weber, UK より供与)を含む。この血清パネル(n=28)は、HIV-1 亜型Aの血清(ルワンダより5血清、ウガンダより1血清)、亜型Bの7血清(ブラジルより)、亜型Cの4血清(ブラジルより)、亜型Dの4血清(ウガンダより)、亜型Eの6血清(タイより)、亜型Fの1血清(ブラジルより)を含む。

【0095】図18Bは、これら複数の国に由来するそれぞれの血清に対する組換えqp120-E(縦軸)または組換えqp120-B(横軸)のEIA反応性を2次元で表したものである。図からわかるように、HIV-1 亜型Eおよび亜型B血清は、特異的に同じ亜型の組換えqp120と特異的に反応した。それに対し、その他の亜型の血清は、亜型が非特異的であることを反映して、組換えqp120-Eや組換えqp120-Bとは低いレベルでしか反応せず、反応のなんらの傾向も認められなかった。

【0096】

【発明の効果】本発明により、従来では困難だった強毒型インフルエンザに対するワクチンを製造することが可能となった。本発明のインフルエンザワクチンを製造するためのセンダイウイルスベクターは、インフルエンザウイルスそのものとは異なり毒性が低く、また従来のインフルエンザワクチンと同様に鶏卵を使って製造できるため、安全で簡便なインフルエンザワクチンの製造が可能となる。また、本発明のセンダイウイルスベクターで製造された病原体由来タンパク質は高い免疫反応性を有するため、免疫原用タンパク質や免疫分析用タンパク質として好適に用いることが可能である。

【0097】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Dनावेक Research Inc.

<120> Vaccines and curative agents using Sendai virus vector.

<130> D3-006

<140>

<141>

<160> 5

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 30



31

32

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 1

aagcggccgc tctgtcaaaa tggagaaaat

30

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 70

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially synthesized primer sequence

&lt;400&gt; 2

aagcggccgc gatgaacttt caccctaagt tttcttact acggcgtacg ttaaatgcaa 60  
attctgcatt 70

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 1770

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (20)..(1717)

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: an  
artificially amplified HA sequence

&lt;400&gt; 3

aagcggccgc tctgtcaaa atg gaa gaa ata gtg ctt ctt ttt gca ata gtc 52

Met Glu Glu Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val

1

5

10

agt ctt gct aga agt gac caa att tgc att ggt tac cat gca aac aac 100

Ser Leu Ala Arg Ser Asp Gln Ile Cys Ile Gly Tyr His Ala Asn Asn

15

20

25

tca aca aaa caa gtc gac aca ata atg gaa aag aat gtt act gtc aca 148

Ser Thr Lys Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys Asn Val Thr Val Thr

30

35

40

cat gcc caa gac ata ctt gaa aaa aca cac aac ggg aag ctc tgc agc 196

His Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Ser

45

50

55

cta aat gga gtg aag cct ctc att ttg aag gat tgt agt gta gct gga 244

Leu Asn Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly

60

65

70

75

tgg ctc ctc gga aat cct atg tgt gac gaa ttc ctt aat gtg cca gaa 292

Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu

80

85

90

tgg tct tac ata gta gaa aag gat aat cca gtc aat ggc ctt tgc tac 340

Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys Asp Asn Pro Val Asn Gly Leu Cys Tyr

95

100

105

33	34
cga ggg gat ttc aac gac tac gaa gaa ctg aaa cat cta tta agt tgt	388
Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr Glu Leu Lys His Leu Leu Ser Cys	
110 115 120	
acg aaa cat ttt gag aaa att cga atc atc ccc aga gat tcc tgg ccc	436
Thr Lys His Phe Glu Lys Ile Arg Ile Ile Pro Arg Asp Ser Trp Pro	
125 130 135	
aac cat gaa gcc tca tta gga gta agc tct gca tgt cca tac aat ggg	484
Asn His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala Cys Pro Tyr Asn Gly	
140 145 150 155	
agg tct tct ttt ttc agg aat gtg gta tgg ctt atc aaa aag aac aat	532
Arg Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn	
160 165 170	
gca tac cca aca ata aag agg agt tac agc aat act aat aaa gaa gat	580
Ala Tyr Pro Thr Ile Lys Arg Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Lys Glu Asp	
175 180 185	
ctt cta ata ctg tgg gga att cac cat cct aat gat gca gca gag caa	628
Leu Leu Ile Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln	
190 195 200	
acc aag ctc tat caa aac cca acc act tat gtc tcc gtc gga aca tca	676
Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser	
205 210 215	
aca ctg aat caa aga tca att cca aaa ata gcc act agg ccc aaa tta	724
Thr Leu Asn Gln Arg Ser Ile Pro Lys Ile Ala Thr Arg Pro Lys Leu	
220 225 230 235	
aat ggg caa agt gga aga atg gaa ttc ttt tgg acg att ttg aag cca	772
Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro	
240 245 250	
agt gat acc atc aat ttt gag agt aat gga aac ttc att gct cca gag	820
Ser Asp Thr Ile Asn Phe Glu Ser Asn Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu	
255 260 265	
tat gcc tat aaa att gtc aag aag ggg gac tca gca atc atg aaa agt	868
Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser	
270 275 280	
gga ttg gaa tat ggt aac tgc aat act aag tgt caa act cca ata ggt	916
Gly Leu Glu Tyr Gly Asn Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly	
285 290 295	
gcg ata aat tcc agc atg cca ttc cac aat ata cat cct ctt acc att	964
Ala Ile Asn Ser Ser Met Pro Phe His Asn Ile His Pro Leu Thr Ile	
300 305 310 315	
gga gaa tgc ccc aaa tac gtg aaa tca gat aga ttg gtc ctt gca act	1012
Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asp Arg Leu Val Leu Ala Thr	
320 325 330	
gga ctc agg aac acc cct caa aga aaa aga aaa aag aga ggt cta ttt	1060
Gly Leu Arg Asn Thr Pro Gln Arg Lys Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe	
335 340 345	
gga gct atg gca ggc ttc ata gag ggg gga tgg caq gga atg gta gac	1108
Gly Ala Met Ala Gly Phe Ile Glu Gly Gly Trp Gln Gly Met Val Asp	
350 355 360	

35 36  
 ggt tgg tat ggt tac cac cat agc aac gag cag ggg agt gga tat gct 1156  
 Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala  
 365 370 375  
 gca gac aaa gaa tcc acc caa aag gca ata gat gga atc acc aat aag 1204  
 Ala Asp Lys Glu Ser Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys  
 380 385 390 395  
 gtc aac tca atc att gac aaa atg aac acc cag ttt gag gca gtt ggg 1252  
 Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val Gly  
 400 405 410  
 aag gaa ttt aat aac tta gag aga aga ata gaa aat ttg aac aag att 1300  
 Lys Glu Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Ile  
 415 420 425  
 ttg gaa gac ggg ttt cta gat gtt tgg act tat aat gct gaa ctt cta 1348  
 Leu Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn Ala Glu Leu Leu  
 430 435 440  
 gtt ctc atg gaa aat gaa aga act cta gat ttt cat gac gca aac gta 1396  
 Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ala Asn Val  
 445 450 455  
 aag agc ctt tac gac aag gtt cga cta cag ctt aag gat aat gca agg 1444  
 Lys Ser Leu Tyr Asp Lys Val Arg Leu Gln Leu Lys Asp Asn Ala Arg  
 460 465 470 475  
 gaa ctg ggt aat ggt tgt ttc gag ttc tac cat aaa tgt gac aat gaa 1492  
 Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr His Lys Cys Asp Asn Glu  
 480 485 490  
 tgt atg gaa agc atc aga aac gga aca tat aac tat cca cag tat tca 1540  
 Cys Met Glu Ser Ile Arg Asn Gly Thr Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr Ser  
 495 500 505  
 gaa gag gca aga cta aac agg gaa gaa ata agt ggg atc aaa ttg gaa 1588  
 Glu Glu Ala Arg Leu Asn Arg Glu Glu Ile Ser Gly Ile Lys Leu Glu  
 510 515 520  
 tca atg gga att tat caa ata ctg tca att tat tca aca gtg gcg agt 1636  
 Ser Met Gly Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser  
 525 530 535  
 tcc cta gca ctg gca atc atg ata gct ggt cta tct ttc tgg atg tgc 1684  
 Ser Leu Ala Leu Ala Ile Met Ile Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys  
 540 545 550 555  
 tcc aat gga tca ttg cag tgc aga att tgc att taacgtacgc cgtagtaaga 1737  
 Ser Asn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile  
 560 565  
 aaaacttaagg gtgaaagtcc atcgcggccc ctt 1770  
 <210> 4  
 <211> 46  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: an  
 artificially synthesized primer sequence  
 <400> 4  
 aagcggccc aagacagtgg aaatgagagt gaaggagaca cagatg  
 <210> 5

37  
 <211> 69  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220>  
 <223> Description of Artificial Sequence: an  
 artificially synthesized primer sequence  
 <400> 5  
 ttgcggccgc gatgaacttt caccctaagt tttcttact acggcgtacg tcattctttt 60  
 tctctctcc 69

# 【図面の簡単な説明】

【図1】トリインフルエンザウイルスをマウスで継代したときの、マウスにおける肺内ウイルス増殖の時間経過、マウスの体重変化、および、肺の肉眼病変を示した図である。十字はマウスが死亡したことを表す。

【図2】卵継代株(M-0)、マウス継代3代目(M-3)、およびマウス継代5代目(M-5)のトリ由来インフルエンザウイルスを $1 \times 10^4$  CIUでマウスに感染させたときの肺内ウイルス増殖の時間経過、マウスの体重変化、および、肺の肉眼病変を示した図である。十字はマウスが死亡したことを表す。

【図3】インフルエンザウイルスHA遺伝子を組み込んだセンダイウイルスベクターの構造を示す図である。HA遺伝子を含むDNA断片をセンダイウイルスベクターのNotI部位に組み込んだ。「E」および「S」は、それぞれセンダイウイルスの転写終結配列および転写開始配列を表す。「N」、「P」、「M」、「F」、「HN」、および「L」はセンダイウイルスの遺伝子を表す。

【図4】抗H5<Term/SA>蛍光抗体を用いた、HA組換えセンダイウイルス(SeV/tukH5)およびその対照(SeV/V(-))の染色像を表す顕微鏡写真である。

【図5】抗インフルエンザH5抗体を用いた、組換えセンダイウイルス産生細胞から抽出したタンパク質のウェスタンブロット解析の結果を表す図である。

【図6】精製センダイウイルス粒子から抽出したタンパク質のSDS-PAGEおよびウェスタンブロット解析の結果を表す図である。

【図7】精製センダイウイルス(SeV/tukH5)粒子を抗原として免疫し、作製したニワトリ抗血清の反応性を解析した結果を示す図である。SeV、SeV/tukH5、およびFluVは、それぞれSeV/V(-)、SeV/V(-)、およびインフルエンザウイルスより抽出したタンパク質を泳動したことを示す。

【図8】SeV/tukH5(右)ウイルス粒子中のH5タンパク質の局在を示す免疫電子顕微鏡写真である。対照にSeV/V(-)(左)も用いた。

【図9】組換えセンダイウイルスをマウスに接種したときの、マウスにおける肺内ウイルス増殖の時間経過、マウスの体重変化、および、肺の肉眼病変を示した図であ

る。十字はマウスが死亡したことを表す。

【図10】マウスへの組換えセンダイウイルスの接種、およびインフルエンザウイルスのチャレンジにおける体重変化を示す図である。上段はセンダイウイルス未接種、中段はセンダイウイルスを $3 \times 10^7$  CIU接種、下段はセンダイウイルスを $3 \times 10^7$  CIU接種の後、 $5 \times 10^7$  CIUでブースターをかけた場合を示す。

【図11】マウスへの組換えセンダイウイルスの接種、およびインフルエンザウイルスのチャレンジを行ったときの、マウスにおけるインフルエンザウイルスの肺内増殖の時間経過、マウスの体重変化、および、肺の肉眼病変を示した図である。抗H5抗体価(白)および抗H5抗体価(黒)を下段に示した。

【図12】HIV-1 亜型E qp120(SeV/qp120-E)を発現する組換えセンダイウイルス作製のプラスミド pSeV/qp120-Eの構築を示す図である。qp120のオープンリーディングフレームの直後にSeVの転写調節シグナル(EおよびS)が付加されたDNA断片を、NotIタグ付きのプライマーを用いて増幅させ、SeVゲノム全長(15,402塩基)を生成するプラスミド pSeV(+)-18bV(-)のNotI部位に挿入した。

【図13】CV-1細胞における組換えセンダイウイルス(SeV/qp120-E)からの組換えqp120-Eの発現を示す図である。(A)はSeV/qp120-Eを感染させたCV-1細胞の培養上清100 $\mu$ lに含まれるタンパク質の産生の時間経過を示す。バキュロウイルス系で発現させたHIV-1 亜型E Q株の組換えqp120をキャリブレーションマーカーとして用いた(50ng $\sim$ 500 $\mu$ g)。ゲルから膜に転写した後、HIV-1 亜型Eに感染したタイ人の患者10人の血清のブールをプローブとしてウェスタンブロット解析を行った。(B)は、SeV/qp120-Eを感染させたCV-1細胞の、各時間における培養上清中のSeV/qp120-E量を、パネルAのウェスタンブロットから決定した結果を示す。(C)は親センダイウイルス(SeV(+)-18bV(-)) (レーン「wt」)、SeV/qp120-B (レーンB)、または SeV/qp120-E (レーンE)を感染させたCV-1細胞の培養上清の銀染色の結果を示す。感染後72時間に、各培養上清を回収した。mAb TQ4B15-2の affinityカラムにSeV/qp120-Eを感染させたCV-1細胞の培養上清を通して精製したSeV/qp120-Eも同時に電気泳動した(レーンP)。MWはブレステインサイズマーカー

ーを示す。矢印はSeV由来の組換えqp120の位置を表す。

【図14】SeV由来の組換えqp120のウェスタンブロット解析を示す図である。HIV-1 亜型Eに感染した7人の患者またはHIV-1 亜型Bに感染した4人の患者の血清と、組換えqp120-Eまたは組換えqp120-Bとの血清学的反応性をウェスタンブロットにより解析した結果である。組換えqp120-E (レーンE)または組換えqp120-B (レーンB)を約100ng含む培養上清(15 $\mu$ l)を各レーンに泳動し、500倍希釈した血清でブローブした。MWはブレステインサイズマーカーの位置を示す。矢印はSeV由来の組換えqp120の位置を表す。

【図15】SeV/qp120-Eにより産生された組換えqp120-Eの機能解析の結果を示す図である。(A)はCD4発現ヒトT細胞株 MT4への組換えqp120-Eの結合を示す。MT4細胞は、HIV-1 亜型EのV3ループペプチドに対して作製された抗V3ループマウスmAb TQ4B15-2 とインキュベートし、さらにFITC結合抗マウスIgGヒツジF(ab')<sub>2</sub>を反応させてFACSscanにより検出した。(B)は、予め図示した量の組換えqp120-Eで細胞をブレインキュベートした時の、MT4細胞に対する抗CD4 mAb (Leu3a) の結合の阻害を示す図である。図中「C」は親ウイルス (SeV) を感染させた細胞の培養上清を用いた対照である。

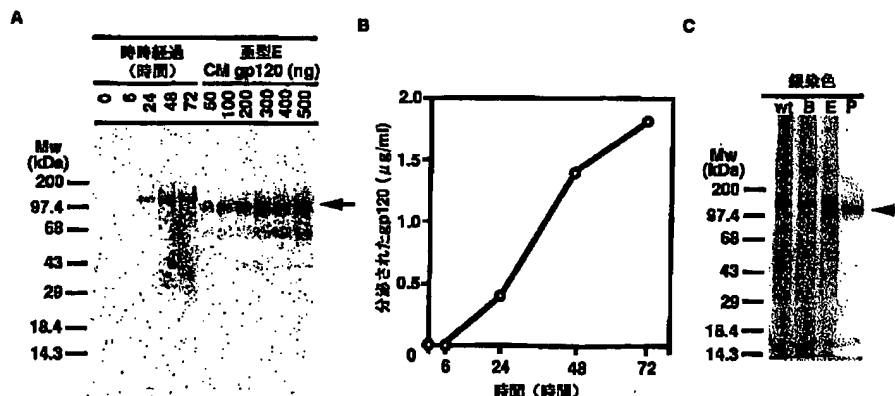
【図16】組換えSeVにより産生された組換えqp120の血清学的反応性を示す図である。(A)は血清パネルを用いた組換えqp120-Eおよび組換えqp120-Bの反応性を示す。血清パネルは88のHIV-1 亜型B陽性血清、76のHIV-1 亜型E感染血清、および21のHIV-1血清陰性の健常者の血清を含む。8,000倍に希釈した血清をEIAに用いた。組換えqp120-Eまたは組換えqp120-Bについて、492nmにおける吸光度(OD)の測定により反応性を決定した。○は各血清試料における反応性を示す。カットオフ値(0.3)は、21の陰性対照の平均吸光度に標準偏差(SD)の7倍を加えた値とほぼ同じである(点線)。(B)はSeV由来の組換えqp120を用いたEIAの特異性を表す図である。組換えqp120-\*

\*E (縦軸)または組換えqp120-B (横軸)に対する各血清(8,000倍希釈)の反応性(OD<sub>492</sub>)を2次的にプロットした。○はHIV-1 亜型E血清、△はHIV-1 亜型B血清を表す。点線は、組換えqp120-Bに対する血清の反応性が組換えqp120-Eに対するものと同じであるときの位置を表す。各プロットは点線の片側にはっきりと分かれていることから、SeV由来のqp120を用いたEIA系はHIV-1 亜型EおよびBに対する亜型特異的抗体を検出できることが示された。

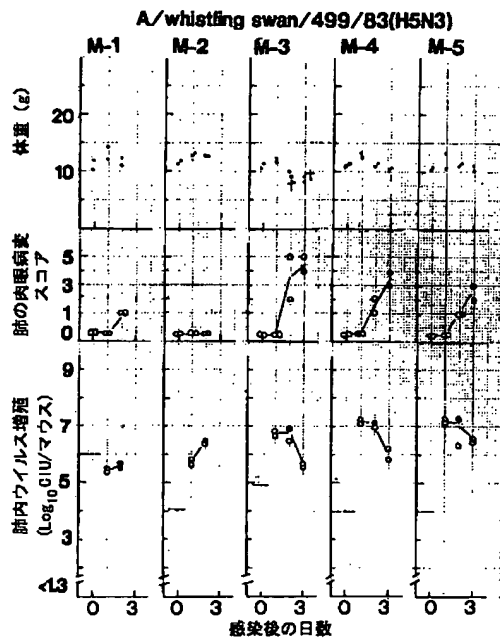
【図17】SeV由来のqp120を用いたEIAの感度をV3ペプチドEIAと比較した結果を示す図である。HIV-1亜型Eまたは亜型Eに感染した患者、あるいは血清陰性の健常者の血清を段階希釈し、組換えqp120-E、組換えqp120-B、V3ペプチド PND-E (HIV-1 亜型Eのコンセンサス配列に由来するV3ペプチド)、またはPND-MN (北アメリカヨーロッパに典型的に見られる単離株であるMN株に由来するV3ペプチド) (Pau, C.P. et al., 1993, AIDS 7: 337-340) に対する反応性を調べた。それぞれのカテゴリーに属する血清から2つを任意に選択し、その平均をプロットした。白丸は組換えqp120-Eに対する亜型E血清の反応性を、白三角は組換えqp120-Bに対する亜型B血清の反応性を、白菱形はPND-Eに対する亜型E血清の反応性を、白四角はPND-MNに対する亜型B血清の反応性を示す。黒丸黒、黒三角、および黒四角はそれぞれ血清陰性の血清試料の組換えqp120-E、組換えqp120-B、およびPND-MNに対する反応性を示す。

【図18】既知の遺伝的亜型(HIV-1 亜型AからH)の一部を含む血清パネルに対するSeV由来の組換えqp120の血清学的反応性を示す図である。(A)は血清パネルを用いた組換えqp120-Eまたは組換えqp120-Bの反応性(OD<sub>492</sub>)を示す。(B)は組換えqp120-E (縦軸)または組換えqp120-B (横軸)に対する各血清パネルのEIAにおける反応性を2次的にプロットしたものである。各HIV-1 亜型の血清は挿入図に示したシンボルで表した。

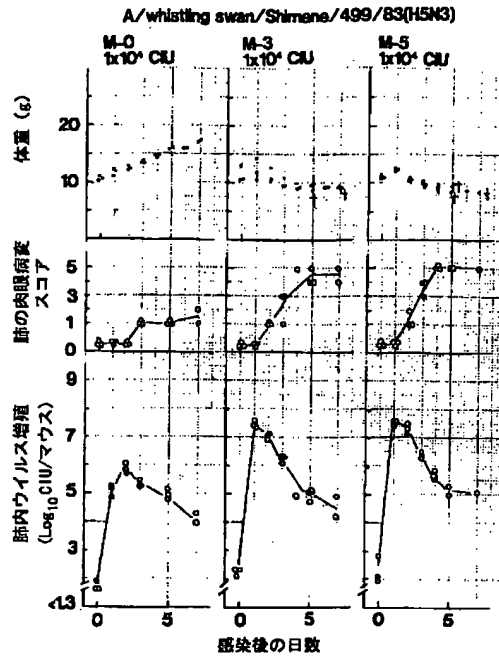
【図13】



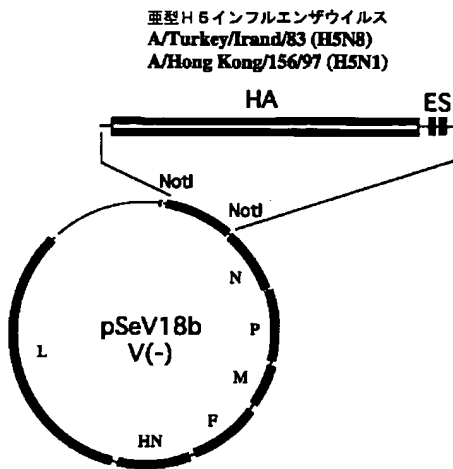
【図1】



【図2】

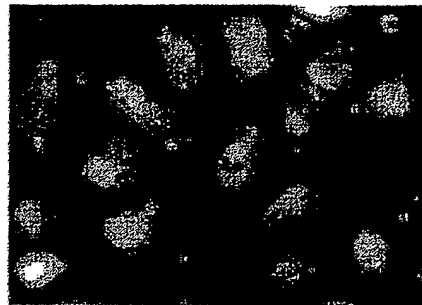


【図3】

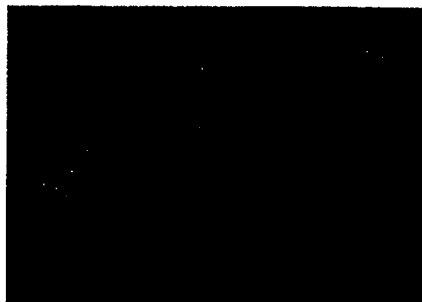


【図4】

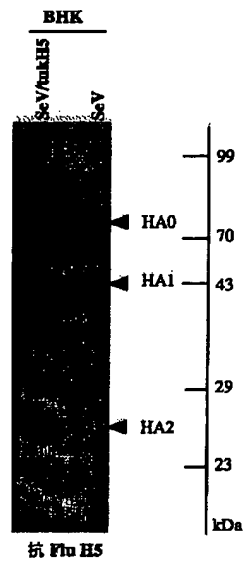
SeV/tukH5



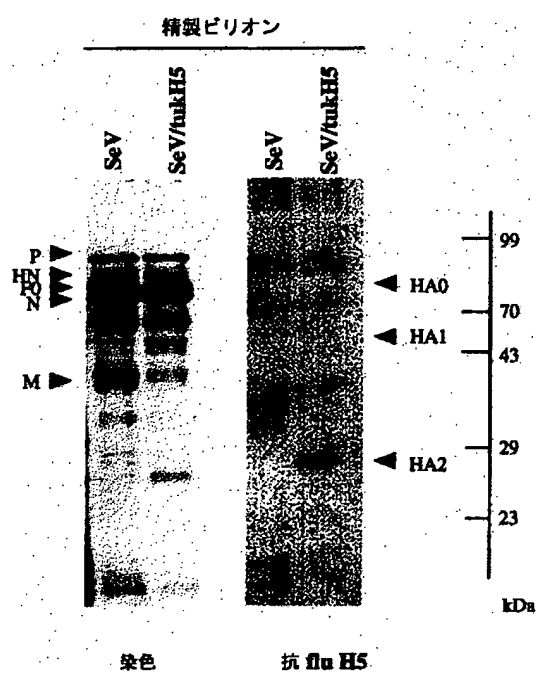
SeV/V(-)



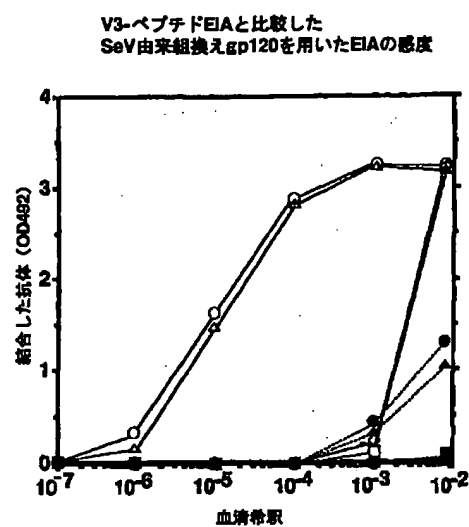
【図5】



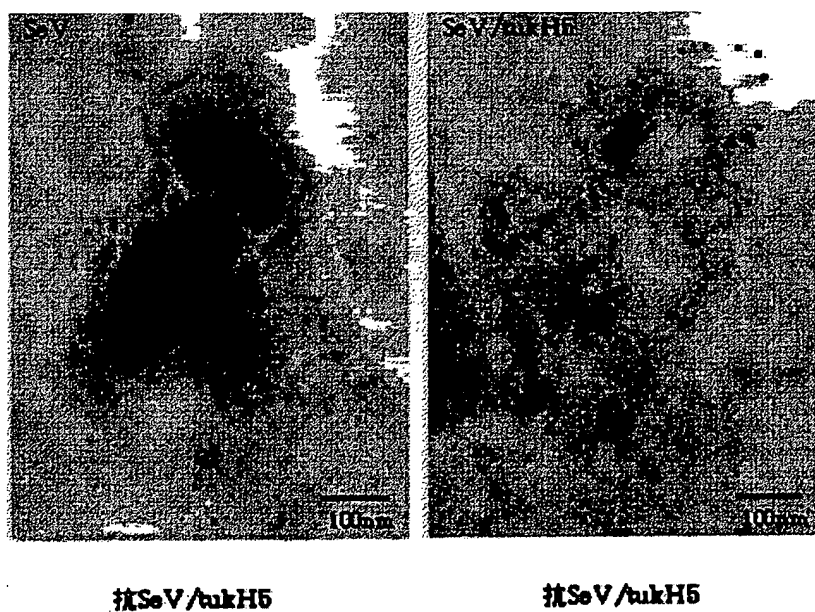
【図6】



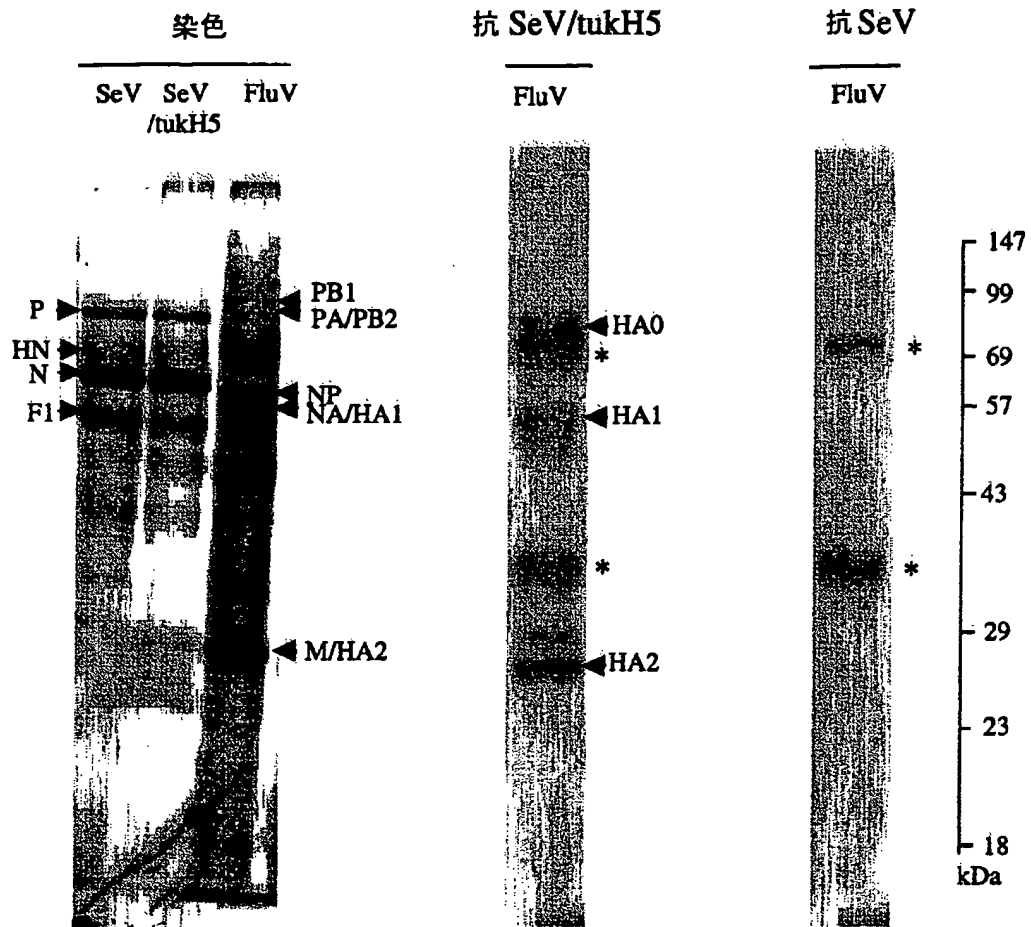
【図17】



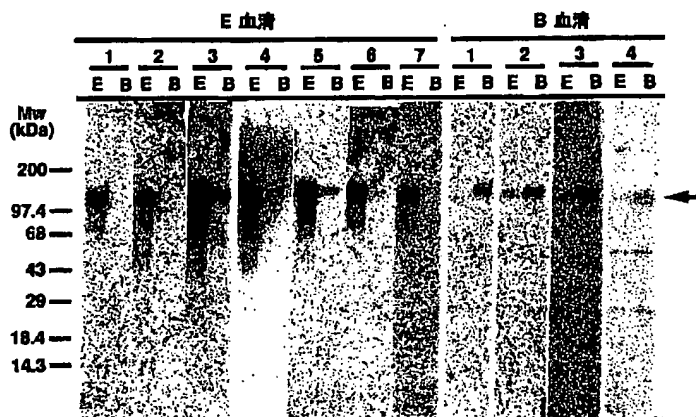
【図8】



【図7】

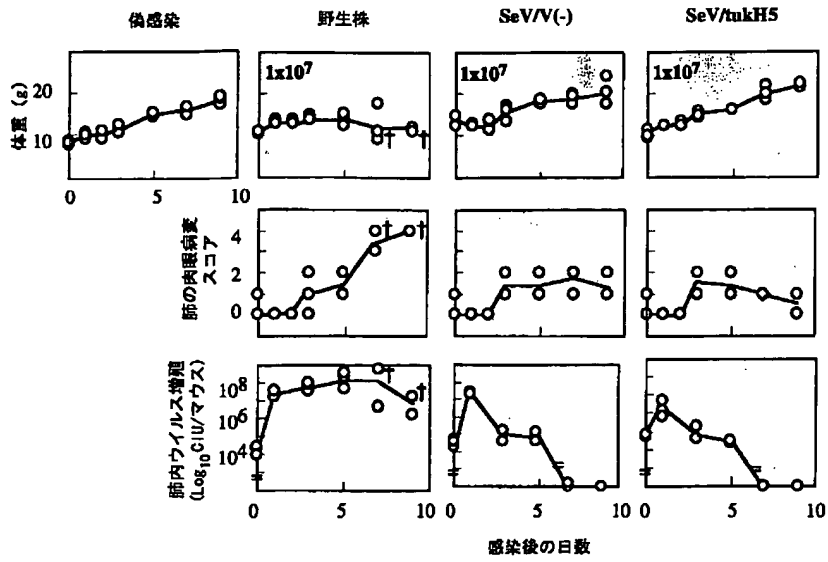


【図14】

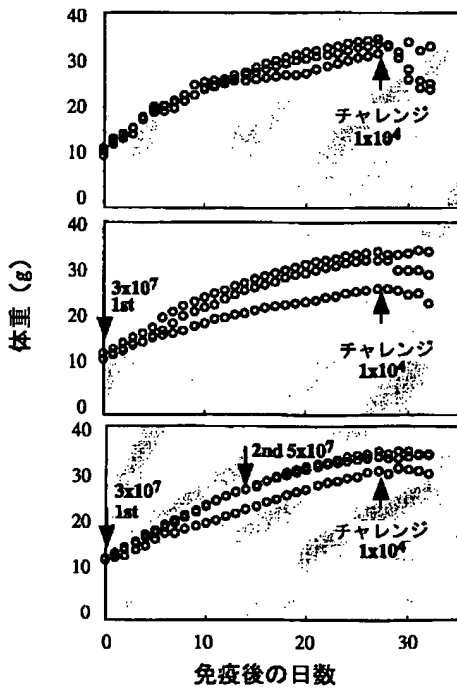




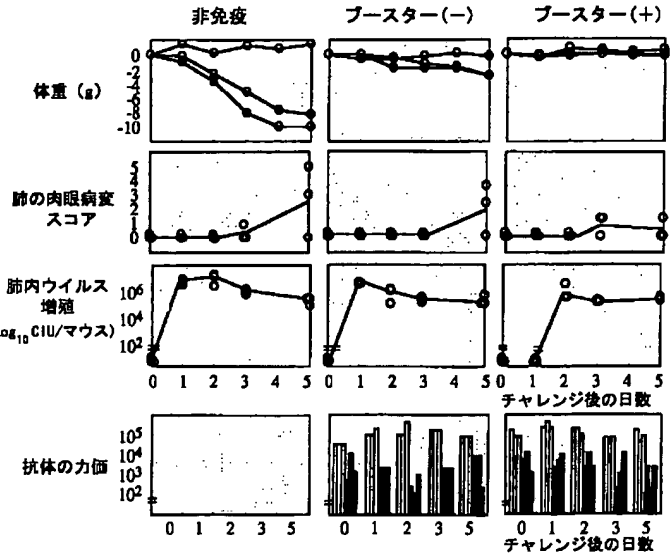
【図9】



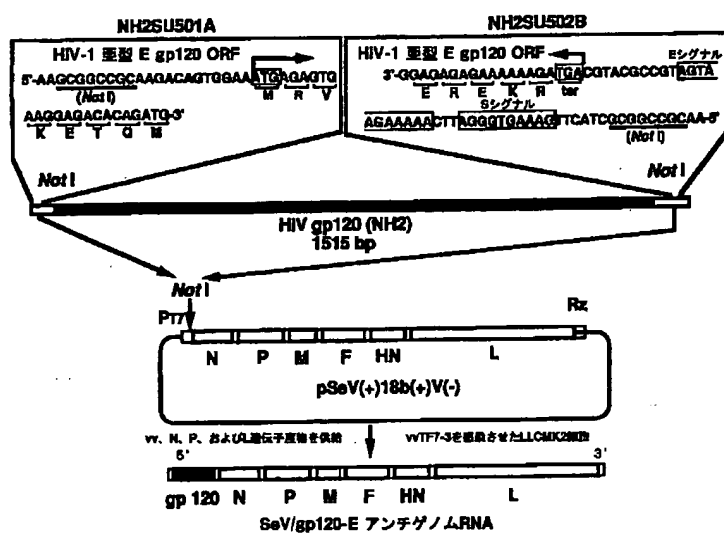
【図10】



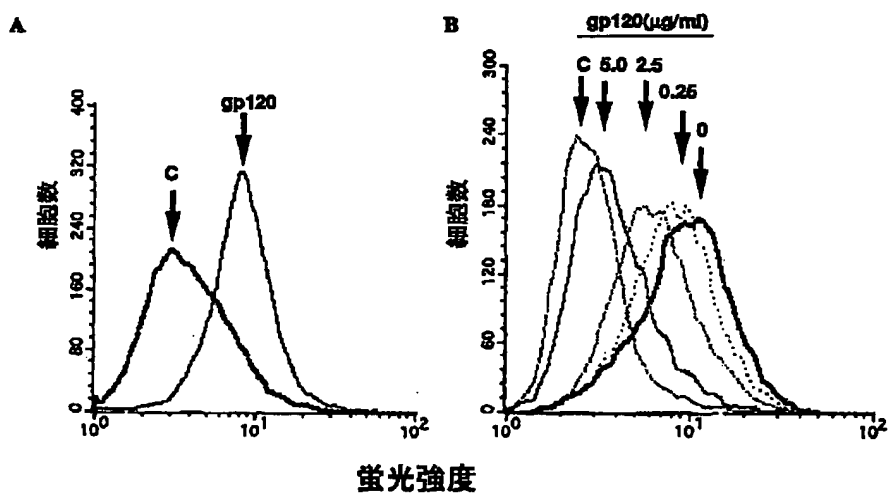
【図11】



【図12】

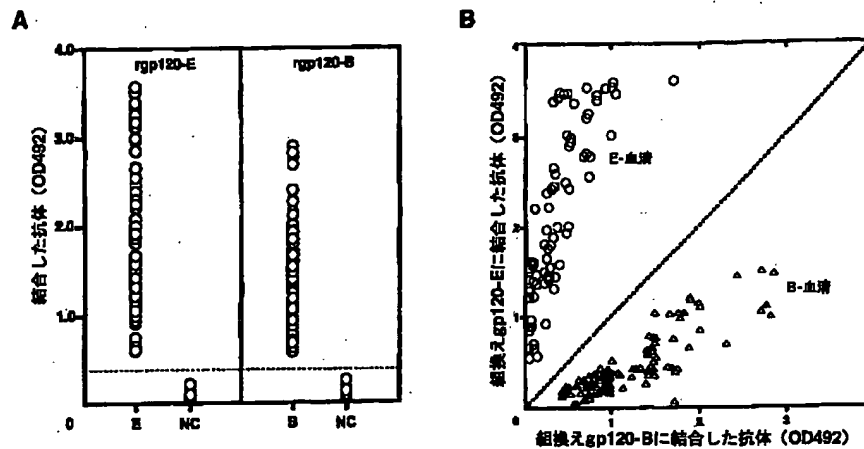


【図15】



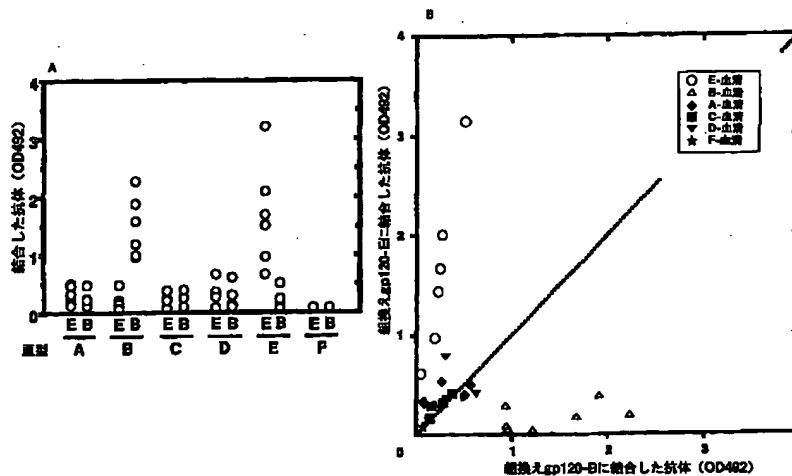
【図16】

## 組換えSeVで産生された組換えgp120を用いたEIA



【図18】

## 亜型A、B、C、D、EおよびFに対する組換えsp120の特異性



フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>  
G 0 1 N 33/569

識別記号

F I  
G 0 1 N 33/569ターマコード (参考)  
L(72)発明者 塩田 達雄  
東京都世田谷区上用賀4丁目4番9号の  
103  
(72)発明者 鳥吉 英伸  
東京都港区白金台4-13-6 白金コーポ  
2 F(72)発明者 武部 豊  
東京都三鷹市井の頭4-24-11  
(72)発明者 永井 美之  
東京都渋谷区恵比寿3-11-17-104

F ターム(参考) 4B024 AA01 BA32 BA80 CA02 DA02  
DA06 EA02 EA04 GA11 GA13  
GA18 HA17  
4B065 AA90X AA95X AA97Y AB01  
AC20 BA02 BA03 BC01 BC50  
BD50 CA24 CA45  
4C085 AA03 BA55 CC05 CC26 DD01  
EE01 GG02 GG03 GG04 GG08  
GG10  
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA01  
CA05 DA86 EA31 EA53 FA71  
FA72 FA74 GA26

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-253876

(43)Date of publication of application : 19.09.2000

---

(51)Int.Cl. C12N 15/09  
A61K 39/145  
C07K 14/11  
C12N 7/02  
C12N 7/04  
G01N 33/569

---

(21)Application number : 11-060918 (71)Applicant : DNAVEC RESEARCH  
INC

(22)Date of filing : 08.03.1999 (72)Inventor : KATO ATSUSHI  
KIYOTANI  
KATSUHIRO  
YOSHIDA TETSUYA  
SHIODA TATSUO  
TORIYOSHI  
HIDENOBU  
TAKEBE YUTAKA  
NAGAI YOSHIYUKI

---

(54) VACCINE USING SENDAI VIRUS VECTOR, AND VACCINE PROTEIN

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain Sendai virus vector capable of simply and safely producing a vaccine against strong poison type influenza which has been difficult hitherto by retaining influenza virus protein or its part so as to be expressible.

SOLUTION: The Sendai virus vector retains strong poison type influenza

virus protein such as subtype H5 or subtype H7 or its part so as to be expressible. Furthermore, the protein is preferably HA protein of A type influenza virus and the influenza vaccine is preferably produced by inoculating Sendai virus vector into hen's egg, proliferating Sendai virus complex in the hen's egg, recovering the proliferated Sendai virus vector from chorio-allantoic liquid of the hen's egg and inactivating the Sendai virus vector. A kit for ELISA of antibody is preferably prepared by using a protein for immunogen capable of obtaining by expressing a gene encoding a protein derived from pathogen integrated into Sendai virus vector so as to be expressible.

---

#### LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 10.02.2006

[Date of sending the examiner's  
decision of rejection]

[Kind of final disposal of application  
other than the examiner's decision of  
rejection or application converted  
registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's  
decision of rejection]

[Date of requesting appeal against  
examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

**\* NOTICES \***

**JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**CLAIMS**

---

[Claim(s)]

[Claim 1] The Sendai Virus vector held possible [ a manifestation of influenza virus protein or its part ].

[Claim 2] The Sendai Virus vector according to claim 1 whose influenza virus is a strong poison type.

[Claim 3] The Sendai Virus vector according to claim 2 whose influenza virus is a subtype H5 or a subtype H7.

[Claim 4] A Sendai Virus vector given in either of claims 1-3 whose protein is HA protein of A mold influenza virus.

[Claim 5] The manufacture approach of the influenza vaccine using a Sendai Virus vector given in either of claims 1-4.

[Claim 6] (a) An approach including the process which inoculates a Sendai Virus vector into a hen's egg, the process which proliferates (b) Sendai Virus complex in a hen's egg, and the process which collects from \*\*\*\*\* of a hen's egg the Sendai Virus vectors which carried out (c) growth according to claim 5.

[Claim 7] The approach according to claim 6 of including further the process which carries out inactivation of the collected Sendai Virus vector.

[Claim 8] The approach according to claim 6 or 7 of including further the process which refines influenza virus protein or its part from a Sendai Virus vector.

[Claim 9] The influenza vaccine which contains the Sendai Virus vector of a publication in either of claims 1-4.

[Claim 10] The influenza vaccine according to claim 9 which is live vaccine of Sendai Virus.

[Claim 11] The influenza vaccine containing the Sendai Virus by which inactivation was carried out according to claim 9.

[Claim 12] The influenza vaccine containing the influenza virus protein refined from the Sendai Virus vector of a publication by either of claims 1-4,

or its part.

[Claim 13] The approach of the WAKUCHI nation to influenza characterized by medicating the intermediate host of influenza viruses other than Homo sapiens with a vaccine given in either of claims 9-12.

[Claim 14] The method according to claim 13 of medicating a respiratory tract with a vaccine.

[Claim 15] The approach according to claim 13 or 14 of carrying out the multiple dose of the vaccine.

[Claim 16] Protein for immunogens which can be obtained by making the gene which carries out the code of the protein of the pathogen origin included in the Sendai Virus vector possible [ a manifestation ] discover.

[Claim 17] Protein for immunity analysis which can be obtained by making the gene which carries out the code of the protein of the pathogen origin included in the Sendai Virus vector possible [ a manifestation ] discover.

[Claim 18] The kit for immunological analysis containing protein according to claim 17 of an antibody.

[Claim 19] The kit for ELISA containing protein according to claim 17 of an antibody.

---

[Translation done.]



**\* NOTICES \***

**JPO and NCIPi are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DETAILED DESCRIPTION**


---

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Field of the Invention] This invention relates to the manufacture approach of the influenza vaccine using the Sendai Virus vector and this vector which are used for manufacture of an influenza vaccine, and the influenza vaccine manufactured using this vector. Moreover, it is related with the object for immunogens and the protein for immunity analysis which can be obtained using a Sendai Virus vector.

[0002]

[Description of the Prior Art] The influenza virus belonging to the department (Orthomyxoviridae) of orthomyxovirus is a pathogenic virus which is infected with many animals including Homo sapiens, and causes respiratory tract infection (influenza). The pain and sense of exhaustion of each part of the whole body which will contain fever, a headache, and a joint in several days if a virus is infected are caused, and it is \*\*\*\* about respiratory symptoms, such as a cough and a pain of a throat. Bronchitis, bacterial pneumonia, otitis media, etc. are sometimes concurred with in many cases, and encephalopathy, myositis, myocarditis, etc. may be caused and serious-illness-ized further. The death rate is [ that it is / serious-illness-/ easy toize ] also high when especially infected with elderly people, a gravid and a lung disease, a heart disease, and a kidney disease patient. Tens of thousands of people fell ill every year, and about 2000 persons have died even in Japan. Also after entering by the end of this century with the Spanish flu which started in 1918 also historically, the Asian flu in 1957, the Hong Kong cold in 1968, and the Russian flu in 1977, in every country in the world in which a lifting and Japan also included pandemia (great fashion) repeatedly, the effect on a health hazard immense from the field of the death toll or the number of disease persons and a social activity is caused.

[0003] The subtype (subtype) of current H1-H15 is known in pandemia especially among influenza viruses by the thing belonging to a lifting or a cone A mold. Homo sapiens, Buta, a mink, a whale, Tori, etc. are distributed widely, and, as for the host of a virus, many subtypes are isolated especially by Tori. There are H1 and H3 in the subtype which carried out pandemia by Homo sapiens until now, and A Hong Kong mold (H3N2), A Soviet Union mold (H1N1), etc. are known as the representative.

[0004] As the prevention approach for current and influenza, Vaccinum influenzae inactivatum is the most in use and the effectiveness is established also epidemiologically. In order to manufacture an influenza vaccine, an influenza virus is usually inoculated in the chorioallantoic membrane of the growth hen's egg around after [ fertilization ] the 10th. Usually, a virus is infected only with chorioallantoic membrane and a virus accumulates it into \*\*\*\*\*. The virus which collects and condenses a virus from \*\*\*\*\* after that, and serves as a raw material of a vaccine is manufactured. From now on, all the virus particle vaccines that carried out inactivation by HORIMARIN etc., HA subunit vaccine which decomposes a virus

and is manufactured from HA protein fraction will be manufactured.

[0005] HA protein is outer shell spike protein which points out blood agglutinin (hemagglutinin; HA) and exists in the front face of an influenza virus particle with neuraminidase (NA).

[0006] It is important for HA protein that the type of the virus which used variation as a vaccine in order to see some variation (antigenic drift) and for an influenza vaccine to function most effectively for this reason, even if it is in a lifting or the same subtype in H1 - H15 which become empty is in agreement. For example, when a new style influenza virus appears, in order to prevent infection effectively, it is desirable to manufacture newly a vaccine with antigenic [ as the virus / completely same ].

[0007] The influenza virus is said for a lifting and a new style influenza virus to appear discontinuous variation with the period of ten - 40 years (antigenic shift). A new style influenza virus appears through what kind of process, and it is not yet solved fully about being infected to Homo sapiens. Although it had been said that these influenza viruses might be conventionally infected to Homo sapiens in bodies, such as Buta, considering a human influenza virus and gene hybridization as a lifting and a new style virus, it also came (KSubbarao et al. and Science 279:393-396 (1998)) to be known that the influenza virus which makes other type animals, such as Tori, a host will be infected to direct Homo sapiens.

[0008] the influenza virus of the subtype H5 which makes Tori a host, or subtype H7 grade is known as a strong poison type — \*\*\*\* (Y.Kawaoka et al., Virology 158:218-227; (1987) J.A.Walker and Y.Kawaoka, and J.General Virol.74:311-314 (1993)) — it is apprehensive about possibility that these viruses will acquire the infectivity to Homo sapiens. In May, 1997 and afterwards, till then, although checked by Tori, by Homo sapiens, two or more checks of the infected person of subtype H5 influenza virus (H5N1) who had not been found were actually carried out. Manufacturing the vaccine to these influenza viruses immediately is called for.

[0009] In order to infect an influenza virus with a cell, HA protein (HA0) is cut in part by trypsin Mr. protease, and it is supposed that it is necessary to cleave it to HA1 and HA2. If HA1 sticks to the sialic-acid acceptor of cell surface, virion will be incorporated by intracellular lysosome by endocytosis, membrane fusion will happen under acid conditions, and infection will be materialized. The influenza virus of a conventional type with the trypsin Mr. protease which exists only in lungs or an upper airway Gln/Arg-X-Arg of HA protein Since C one end is cut, it cleaves and reinfection is materialized into the cell which adjoined, The infection part of influenza was restricted around the respiratory tract section (). [ Robert A.Lamb and Robert M.Krug. ] [ 'Orthomyxoviridae:The Viruses and Their ] Replication' in Fields Virology, Third ed., edited by B.N.Fields et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.1353-1445, 1996. As opposed to it Some viruses of the subtype H5 looked at by H5-N1 H5N1 flu and Tori or a subtype H7 Since cleavage is carried out with the Furin Mr. enzyme which basic amino acid (Arg-X-Lys/Arg-Arg) exists together with the cleavage part of HA protein, and exists in a large cell strain, It is known that infection will become [ a case fatality rate ] very high in the whole body (). [ Robert A.Lamb and Robert M.Krug. ] [ 'Orthomyxoviridae:The Viruses and Their ] Replication' in Fields Virology, Third ed., edited by B.N.Fields et al., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp.1353-1445, 1996.

[0010] In order to manufacture the vaccine to such a virus, a virus must usually be proliferated by the hen's egg as mentioned above. However, since infection would attain to a germ and the strong poison type virus of a subtype H5 or subtype H7 grade would become fatal [ a germ ] at an early stage if it is infected with a hen's egg, in order to manufacture a vaccine, it was remarkably difficult [ it ] to manufacture sufficient quantity of a virus. Moreover, the manufacture approach of a vaccine that it was not necessary to treat a strong poison type virus direct picking also from a viewpoint on insurance was desired.

[0011] Manufacture of the influenza vaccine stock which introduced variation at least into the protease cutting section and used HA gene of a strong poison type influenza virus (H5N1) as

the attenuated mold until now is tried (the 46th time scientific meeting of the Japanese Society for Virology and a general meeting besides Shuichi Nishimura, IIE 26 and 1998). However, since this vaccine stock still contains the genome of an avian influenza virus, it fully needs to check the safety to Homo sapiens.

[0012] Moreover, the attempt which produces the protein of an influenza virus, without using a hen's egg has so far been performed. For example, the influenza virus HA gene of a subtype H1 is included in a bubble nature stomatitis virus (Vesicular stomatitis virus; VSV). HA protein is made to discover. The effectiveness of an influenza vaccine the verified report --- it is (J.Virol.71[ Kretzschmar, E., et al., 1997, and ]: 5982-5989; Roberts, A.et al., 1998, J.Virol.72:4704-4711) --- It does not experiment about the strong poison type influenza virus. Moreover, in order to carry out systemic infection of this vector to the mouse prescribed for the patient, it worries about the virulence of the vector to a host. the system using a baculovirus and a silkworm in vaccine manufacture of a new style influenza virus (H5N1) is also tried --- \*\*\*\* (Nihon Keizai Shimbun, February 14, 1998, a morning paper, 10th page) --- about the vaccine effectiveness, it is not confirmed to current.

[0013] As an example of the vaccine using the single-stranded-RNA virus of a non-articulating mold, G.W.Wertz's and others patent (WO 96/10400) is known. However, the structural protein of the optimal vaccine to assert is the thing of the single-stranded-RNA virus origin. Moreover, orthomyxovirus is not mentioned into the pathogen which serves as a candidate of the vaccine development shown in Table 1 of WO 96/10400, but it is influenza especially. A mold H5N1 It is not claimed. Therefore, the above-mentioned reference only shows the possibility of use as a common vaccine of the single-stranded-RNA virus of a non-articulating mold, and is also in an example. The effectiveness in in vivo is not shown.

[0014]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] This invention makes it a technical problem to offer the manufacture approach of the influenza vaccine using a Sendai Virus vector useful to manufacture of the vaccine to a strong poison type influenza virus, and this vector, the influenza vaccine manufactured using this vector, the object for immunogens which can be obtained using a Sendai Virus vector, and the protein for immunity analysis.

[0015]

[Means for Solving the Problem] this invention persons have so far shown that Sendai Virus is very useful as a proteinic expression vector and a vector for transgenics to a cell or an individual (refer to the international public presentation 97/No. 16538 and international public presentation 97/No. 16539). A Sendai Virus vector has low toxicity and its amount of protein discovered from the introduced gene is very high. Moreover, it is not introduced to a host chromosome, and since a manifestation is passing away-like, it excels also in safety. this invention persons found out that a Sendai Virus vector was useful as the vaccine to an influenza virus, and a production vector of this vaccine from such a description that a Sendai Virus vector has.

[0016] In order to manufacture the vaccine to an influenza virus efficiently, this invention persons manufactured the recombinant which uses Sendai Virus and has the gene of an influenza virus, and manufactured Sendai Virus which contains influenza virus protein using such recombinant. Consequently, it found out that the protein of a strong poison type influenza virus was manufactured efficiently by using such recombinant. Furthermore, the vaccine using the Sendai Virus vector of this invention found out that the very high vaccine effectiveness was acquired to a strong poison type influenza virus.

[0017] moreover, this invention persons --- envelope protein of a human immunodeficiency virus (HIV-1) the place which produced the Sendai Virus vector which discovers gp120, and investigated the immunoreactivity of a HIV infected person's blood serum using this vector --- gp120 recombination protein of this vector origin --- a HIV infected person's blood serum ---

very much -- strong -- and the subtype of HIV-1 -- it found out reacting specifically.

[0018] Namely, the Sendai Virus vector for which this invention is used for manufacture of an influenza vaccine, The manufacture approach of the influenza vaccine using this vector, the influenza vaccine manufactured using this vector, It is related with the object for immunogens and the protein for immunity analysis which can be obtained using a Sendai Virus vector. And more specifically (1) The Sendai Virus vector held possible [ a manifestation of influenza virus protein or its part ], (2) A Sendai Virus vector given in (1) whose an influenza virus is a strong poison type, (3) An influenza virus is a subtype H5 or a subtype H7. Sendai Virus vector given in (2) (4) Protein is HA protein of A mold influenza virus. Sendai Virus vector given in either of (1) to (3) (5) The manufacture approach of the influenza vaccine using a Sendai Virus vector given in either of (1) to (4), (6) The process which inoculates (a) Sendai Virus vector into a hen's egg, (b) The process which proliferates Sendai Virus complex in a hen's egg, and the process which collects from \*\*\*\*\* of a hen's egg the Sendai Virus vectors which carried out (c) growth, \*\*\*\*\*, approach given in (5) (7) Include further the process which carries out inactivation of the collected Sendai Virus vector. Approach given in (6) (8) Include further the process which refines influenza virus protein or its part from a Sendai Virus vector. (6) Or approach given in (7) (9) The influenza vaccine which contains the Sendai Virus vector of a publication in either of (1) to (4), (10) An influenza vaccine given in (9) which is the live vaccine of Sendai Virus, (11) An influenza vaccine given in (9) containing the Sendai Virus by which inactivation was carried out, (12) The influenza vaccine containing the influenza virus protein refined from the Sendai Virus vector of a publication by either of (1) to (4), or its part, (13) It is characterized by medicating the intermediate host of influenza viruses other than Homo sapiens with a vaccine given in either of (9) to (12). The approach of the WAKUCHI nation to influenza (14) Medicate a respiratory tract with a vaccine. Approach given in (13) (15) (13) which carries out the multiple dose of the vaccine, or an approach given in (14), (16) It can obtain by making the gene which carries out the code of the protein of the pathogen origin included in the Sendai Virus vector possible [ a manifestation ] discover. Protein for immunogens (17) It can obtain by making the gene which carries out the code of the protein of the pathogen origin included in the Sendai Virus vector possible [ a manifestation ] discover. Protein for immunity analysis (18) Kit for immunological analysis of an antibody which contains the protein of a publication in (17) (19) It is related with the kit for ELISA of an antibody which contains the protein of a publication in (17).

[0019] In addition, a vaccine means the constituent which induces an immunoreaction.

Moreover, in this invention, in subtype H1N1 known from the former, or H3N2, strong poison type influenza viruses differ and mean a toxic high influenza virus. Subtype H5 virus, subtype H7 virus, the virus by which infection attains to a germ by inoculation to a hen's egg, and the virus to which the catalyst of the cleavage of HA protein is carried out with a Furin Mr. enzyme are included in such a virus.

[0020] Subtype H5 virus of influenza A and H7 virus are related to the strong toxicity of birds. It is known that the reason will be based on the property in which these types of HA cleaves without supply of a foreign protease (Fields Virology, vol.1, Chapter46, p1410, Table2; Nestorowicz, A.et al., Virology, 1987, 160:411-418). Therefore, the influenza virus which has the same cleavage device is considered that the property as a strong poison type can be shown.

[0021] In addition, the subtype of influenza is defined by antigenic (refer to reference "Fields Virology, vol.1, Chapter 46, and p1399", or "WHO Memorandum A revised system of nomenclature for influenza virus Bull WHO 1980, 58 and p585-591").

[0022]

[Embodiment of the Invention] This invention offers the Sendai Virus vector held possible [ a manifestation of influenza virus protein or its part ]. In this invention, with a "Sendai Virus

vector", it originates in Sendai Virus and the complex which has infectivity is included. Moreover, in this specification, "infectivity" means the capacity which can introduce the nucleic acid inside complex etc. into intracellular, when complex holds the adhesion ability and membrane fusion ability to a cell.

[0023] The Sendai Virus vector held possible [ a manifestation of influenza virus protein or its part ] is useful to manufacture of an influenza vaccine, or manufacture of the viral antigen for a diagnosis. Influenza virus protein says the protein in which an influenza virus genome carries out a code. Specifically, NS1, NS2, M2, etc. are contained other than virion configuration protein, such as a nucleoprotein (NP) of capsid, a matrix (M1), polymerase (PA, PB1, PB2), a hemagglutinin (HA), and neuraminidase (NA). In order to use for manufacture of an influenza vaccine, the protein which has immunogenicity, or its partial peptide is used. Each above-mentioned protein has immunogenicity, can make these protein or its part (partial peptide which has immunogenicity) able to discover using a Sendai Virus vector, and can manufacture a vaccine. These protein may be used independently or may be used combining plurality. Especially in this invention, it is desirable to use HA which is outer shell spike protein of an influenza virus particle, and/or NA. HA is used more preferably.

[0024] For example, required yes by which the gene itself which carries out the code of this protein group is not necessarily contained in the virus vector of this invention although it is thought that the protein group made from NP, P/C, and L gene is required in order for a virus to reproduce autonomously in a Sendai Virus vector. For example, it manufactures using the host cell which has the gene which carries out the code of this protein group for the vector of this invention, and this protein group may be supplied from this host cell. moreover, the amino acid sequence of these protein groups -- the array of the virus origin -- even if it does not remain as it is, as long as it becomes [ whether the activity in installation of a nucleic acid is equivalent to it of a natural mold, and ] more than it, variation may be introduced or the homologous gene of other viruses may be substituted.

[0025] Moreover, required yes by which the gene itself which carries out the code of this protein group is not necessarily contained in the virus vector of this invention although it is thought that the protein group made from M, F, and HN gene is required in order for a Sendai Virus vector to have the propagation force, for example. For example, it manufactures using the host cell which has the gene which carries out the code of this protein group for the vector of this invention, and this protein group may be supplied from this host cell. moreover, the amino acid sequence of these protein groups -- the array of the virus origin -- even if it does not remain as it is, as long as it becomes [ whether the activity in installation of a nucleic acid is equivalent to it of a natural mold, and ] more than it, variation may be introduced or the homologous gene of other viruses may be substituted.

[0026] Influenza virus protein can be made to discover by introducing an influenza virus genome gene to a Sendai Virus vector. In this way, the complex of a recombination virus can be obtained by [ by which it was produced ] rearranging, making a viral genome imprint by the inside of a test tube, or intracellular, and making a virus reconfigure. Such virus reconstruction is already developed (refer to international public presentation 97/No. 16539).

[0027] Moreover, even if it is not a perfect Sendai Virus genome, it is possible to use as incomplete viruses, such as DI molecule (8417 J. Virol. 68, 8413- 1994), and a component from which the compound oligonucleotide etc. constitutes complex.

[0028] The complex with which all the genes of M and F in connection with the propagation force, and HN gene were contained can be used for Sendai Virus. Here, the "propagation force" means "the capacity which can form the complex according to an infective particle or it after a nucleic acid is introduced into intracellular by infection or artificial technique and this nucleic acid that exists in intracellular reproducing, and can be spread into another cell." However, deletion or a functional target can be made to do inactivation of the gene in

connection with the propagation force from the viral genome contained in the reconfigured complex in the propagation force which a natural mold has deletion or in order to weaken. In the case of Sendai Virus, the genes in connection with the propagation force are M, F, and/or a HN gene. The reconstruction method of such complex is already developed (refer to international public presentation 97/No. 16538). For example, in Sendai Virus, the vector which has the genome to which deletion of F and/or the HN gene was carried out can be made from the viral genome contained in the reconfigured complex. Such a vector is also contained in the vector of this invention.

[0029] The adhesion factor which can be pasted up on a specific cell for example, on an envelope front face, ligand, an acceptor, etc. may be included in complex. In order to inactivate the gene which participates in immunogenicity or to raise the imprint effectiveness and the replicative efficiency of RNA, what changed some genes is sufficient as recombinant Sendai Virus.

[0030] The influenza virus protein to introduce can make the suitable part of RNA contained in a Sendai Virus vector insert and discover the gene which carries out the code of this protein. In Sendai Virus RNA, it is desirable to insert the array which has the number of bases of the multiple of six between R1 array and R2 array (67 Journal of Virology, Vol. No. 8, 1993, p.4822 -4830). The inserted amount of foreignness gene expression can be adjusted according to the location of gene insertion, and the RNA base sequence before and behind a gene. For example, in Sendai Virus RNA, it is known that there are many inserted amounts of gene expression, so that an insertion point is close to NP gene.

[0031] The influenza virus protein by which the code was carried out to RNA contained in a vector can be made to discover by introducing this vector into a host cell.

[0032] If the influenza virus of two or more types is used as an antigen, it can make the immunity over the influenza virus of a larger stock acquire, although one kind of influenza virus antigen may be used for a vaccine. When using the influenza virus of two or more types as an antigen, a vaccine can be manufactured using the gene of the virus origin from which there is especially no limit in the combination, for example, subtypes of HA, such as a subtype H5 and a subtype H7, differ. Moreover, it can belong to the subtype of the same HA and the virus from which the subtype of NA differs can also be used. If the gene of two or more influenza viruses can also mix them after manufacturing a vaccine by respectively separate Sendai Virus vector genome \*\*\*\*, two or more genes can be included in the same Sendai Virus vector genome, and it can also be made to discover it.

[0033] 13 sorts of viral strains (A/HK / 156/97 (H5N1) ---) known as an influenza subtype H5 A/Ck/PA/83 (H5N2), and A/Ck/Scot/59 (H5N1), A/Dk/Ir/83 (H5N8), and A/Dk/MI/80 (H5N2), A/Mall/WC/75 (H5N3), and A/Tern/SA/61 (H5N3), A/Tk/Eng/91 (H5N1), and A/Tk/Ir/83 (H5N8), A/Tk/MN/95 (H5N2), and A/Tk/MN/81 (H5N2), When the amino acid sequence of A/Tk/On/66 (H5N9), and HA protein of A/Tk/WC/68 (H5N9) was compared with the maxim matching method, all showed 85% or more of identity mutually. moreover, seven sorts (A/Ck/Japan/24 (H7N7) ---) similarly known as a subtype H7 A/FPV/Rostock/34 (H7N1), and A/FPV/Weybridge (H7N7), Each amino acid sequence of A/Tk/Eng/63 (H7N3), A/Dk/HK / 293/78 (H7N2), A/Ck/Jena/87 (H7N7), and HA protein of A/Ck/Victoria/75 (H7N7) showed 89% or more of identity. Thus, between the same stocks of the subtype of HA, the amino acid sequence of HA protein has high identity. Therefore, possibility that the immunity over the stock of the subtype of different NA belonging to the subtype of the same HA can also be acquired to some extent according to the immunity which used HA protein of one sort of influenza viruses belonging to the subtype of a certain HA as the antigen is high.

[0034] As long as the complex of a virus reconfigurates from a Sendai Virus vector, especially the host cell for vector manufacture used for reconstruction is not restricted. For example, the complex of Sendai Virus can be reconfigured using cultured cells, such as a CVI cell of

the ape kidney origin, and LLCMK2 cell, a BHK cell of the hamster kidney origin. However, in order to obtain complex in large quantities, it is desirable to amplify the obtained complex using a growth hen's egg. As shown in an example, the recombination Sendai Virus of this invention which discovers strong poison type influenza virus protein has low toxicity, and significant cell damage nature is not shown. Therefore, it is possible to manufacture an influenza vaccine in large quantities using a hen's egg unlike the case where the strong poison type influenza virus itself is used. The manufacture approach of the vector using a hen's egg is already developed (the volumes on inside west, (1993), "the advanced technology protocol III and molecule nerve cell physiology" of neuroscience research, a welfare company, Osaka, pp.153-172). A fertilized egg is put into an incubator and, specifically, it is for nine - 12 days. It cultivates at 37-38 degrees C, and a germ is grown up. A Sendai Virus vector is inoculated into a chorioallantoic membrane cavity, an egg is cultivated for several days, and a virus vector is proliferated. Conditions, such as incubation period, may change by the recombination Sendai Virus to be used. Then, \*\*\*\*\* including a virus are collected. Moreover, separation and purification of the Sendai Virus from \*\*\*\*\* can be performed according to a conventional method (Masato Tashiro, a "virus experiment protocol", Nagai, the Ishihama editorial supervision, a MEJIKARU view company, pp.68-73, (1995)).

[0035] The collected Sendai Virus vector can be used as live vaccine. In this invention, a Sendai Virus vector increases in the individual prescribed for the patient, and live vaccine means the thing which makes immunity acquire. As shown in an example, since cell damage nature is low, the strong poison type influenza vaccine which used the Sendai Virus vector of this invention is suitably used as live vaccine. There is no limit in the object which inoculates such live vaccine, and all the animals with which influenza viruses, such as Homo sapiens, Tori, Buta, a horse, and a cow, may be infected are contained. Since an influenza virus has the possibility of the infection to Homo sapiens from nonhuman animals, such as Buta and Tori, it is also effective to use the vaccine of this invention to a nonhuman animal. Moreover, if the Sendai Virus vector to which the above-mentioned propagation force suffered a loss is used, the vaccine which a vector does not spread even if it is live vaccine can be manufactured.

[0036] The collected Sendai Virus can be used again also as all particle vaccines that carried out inactivation. The function of virus original is lost and inactivation means that normal growth will not take place. Thereby, the risk of growth of the virus within the individual which carried out the vaccination is avoidable. Although especially a limit does not have the approach of carrying out inactivation, UV irradiation, formalin processing, etc. are mentioned.

[0037] Moreover, a Sendai Virus vector is made to fragment, rather than all particle vaccines, allergic can be reduced more and tolerance can also be raised. Although especially the approach of fragmentation is not restricted, processing by solvents, such as the ether and chloroform, and/or the ion system, and the non-ion system surfactant is mentioned.

[0038] Moreover, from a Sendai Virus vector, the influenza virus protein made to discover can be separated and refined, and it can also consider as a vaccine. since only the protein of the limited class is contained in a Sendai Virus vector, the influenza virus protein made to discover by intracellular using an expression vector etc. is markedly looked like [ it ] compared with dissociating from all cell extracts, and purification is easy for it. Well-known separation technology can be used for purification of protein. For example, it is also possible to refine by immuno affinity column which was indicated in the example 8 using the antibody to influenza H5 protein. It is expectable that the frequency where generation of heat and the local response after inoculation occur by using purification protein as a vaccine compared with live vaccine or a killed vaccine is stopped.

[0039] Antigen activity stronger against the protein of the pathogen which can be obtained by this invention than the protein of the natural pathogen with which the protein originates is

expectable. That is, it sets in the example and is HIV. env As checked in antigen protein gp120, when a Sendai Virus vector is used as an expression vector according to this invention, the phenomenon in which reactivity of the manifestation product with an antibody improves rather than the synthetic peptide which constitutes the natural epitope of gp120 is checked. In an influenza virus antigen, it is guessed for the ability of strong immune stimulation to also have been attained suppressing cell damage activity low as one of the causes that antigenic was strengthened by use of a Sendai Virus vector. The mechanism with which the pathogen protein which can be obtained by this invention strengthens antigen activity is not clear. However, if the same gene is used at all, variation should not be produced in an amino acid sequence, and antigenic strengthening has possibility of being brought by the difference in change of sugar chain structure, and a proteinic spacial configuration.

[0040] Anyway, the protein of the pathogen which can be obtained by this invention is useful as immunogen protein or protein for immunity analysis for detecting an antibody. When the protein by this invention is used for immunogen, it can expect as a raw material of the vaccine which was excellent in safety and effectiveness with improvement in immunogenicity.

[0041] A vaccine may contain the support or the media (a physiological saline, vegetable oil, suspension, a surfactant, stabilizer, etc.) which are permitted on pharmacology if needed. Moreover, a preservative and other additives can be added. Moreover, in order to raise immunogenicity, immunostimulants, such as cytokine, a cholera toxin, and the Salmonella toxin, can also be added.

[0042] that inoculation of a vaccine is endermic and a nasal cavity — inner — passing — a bronchial tube—muscle — the inside of inner and a vein — or it is carried out in taking orally and gets. Although a dose may be changed with a gestalt, a medication method, etc. of a vaccine, if it is this contractor, it can choose a suitable dose suitably. Since an influenza virus induces symptoms, such as generation of heat, shortly after increasing in the cell of an upper airway, it is desirable that the partial antibody made by the vaccination in this circumference, i.e., the membrane in a nasal cavity, and an upper airway works. For example, although a lot of antibodies are made in inoculation of the vaccine by subcutaneous injection into blood, since there are few amounts of the antibody which exudes to the membrane in a nasal cavity or an upper airway, even when it is effective in serious illness—ized prevention of pneumonia etc., it is thought that the effectiveness over an initial symptom fades. Therefore, it is thought effective to inoculate an influenza vaccine into a respiratory tract according to a nasal spray etc.

[0043] Moreover, since it is thought that it does not have basic immunity especially to a H5N1 flu, it is thought effective to acquire sufficient immunity by 2 times inoculation of a vaccine. In the case of Homo sapiens, spacing of two inoculation is usually two – four weeks.

[0044] All the hosts that have an immune system and are infected with an influenza virus as an animal in which a vaccination is possible are mentioned, and Homo sapiens, a mouse, a rat, a rabbit, Buta, a cow, a horse, an ape, Tori, etc. are contained.

[0045] Moreover, if the protein of the pathogen by this invention is used for the antigen for antibody detection, an immunity analysis system [ that it is more specific and high sensitivity ] can be constituted. In this invention, the sugar protein antigen of a virus etc. can be shown as protein of a pathogen, for example. Many important things as an antigen for immunity analysis of the HA antigen of an influenza virus or the envelope protein gp120 grade of HIV are also contained in the glycoprotein of a virus. The antibody to pathogen protein can be measured using the protein by this invention. The antibody to a pathogen is an important clinical index which shows infection experience of the pathogen. The protein by this invention is applicable to well-known immunological tools of analysis. Since the technique represented especially by ELISA using enzyme labeling can establish a high sensitivity cheaply analysis system, it is desirable. Analysis of the antibody by ELISA has the common technique of



detecting the antibody which a sample is contacted to the solid phase which carried out sensitization of the antigen, and is combined with an antigen by the anti-IgG antibody which carried out enzyme labeling. Or after catching all IgG in a sample using protein A etc., only the antibody to a pathogen is also detectable with the antigen which carried out enzyme labeling. A solid phase antigen and an enzyme labelled antibody required for ELISA can be combined beforehand, and can be supplied as a kit.

[0046]

[Example] Although an example explains this invention concretely below, this invention is not limited to these examples.

[0047] [Example 1] Avian influenza virus separated from the hen's egg in order to obtain the virus which a passage is possible with the production mouse of the mouse conditioning stock of an avian influenza virus, and shows virulence A/whistling swan/Shimane / 499/83 (H5N3) The passage of the stock was carried out by mouse rhinovaccination. The 3rd generation of the mouse passage inoculated the amount of the maximum viruses at the time, and it carried out the passage of the homogenate of the lungs of the mouse which showed the infectivity titer [ be / infection 1-3 day / it / the highest ] to the next generation. A virus named the egg passage stock "M-0", and named the 1-5th generation of the mouse passage "M-1" - "M-5", respectively.

[0048] In connection with the mouse passage, a virus could be promptly conditioned to the mouse, it came to increase it, virulence also became strong, and the mouse which dies of the condition was also observed. That is, in connection with the mouse passage, the proliferation potential of a virus rose and the lung lesion also became strong. Then, the amount of virus inoculation was used as  $1 \times 10^4$  CIU / mouse after the 4th generation. The titer of a virus arrived at the plateau after the 4th generation. Time amount progress of the virus multiplication in lungs at that time, weight change of a mouse, and the macro-scopic lesion of lungs were shown in drawing 1 .

[0049] Growth of the virus in lungs was expressed with the virus titer contained in 10% of the homogenate which mashed and obtained lungs in PBS. moreover — if the macro-scopic lesion of lungs measures the rate of a congestion field to the whole lungs and it becomes <25% 1 — if it becomes 25 to 50% 2 — if it becomes 50 to 75% If it becomes 3> 75% 4 and case where it dies It was referred to as 5 (A.Kato et al. and EMBO J.16:578-587 (1997)).

[0050] About three shares, M-0, M-3, and M-5, rhinovaccination was carried out with  $1 \times 10^4$  CIU / mouse, respectively, and time amount progress of weight change, the macro-scopic lesion of lungs, and the virus multiplication in lungs was measured. The result is shown in drawing 2 . Any stock of the virus multiplication in lungs was rapid, it became [ infection 1-2 day ] max, and the pattern which decrease in number gradually henceforth was shown. However, as compared with the mouse passage stock, extent of growth of the virus in lungs was weak, and, as for M-0, neither the lesion of lungs nor the mouse which is slight illness, and most reduction of weight is not seen but dies was seen clearly. Although the big difference was not looked at by virus multiplication between M-3 and M-5, as for the lesion of lungs, and extent of a loss weight, M-5 was stronger.

[0051] Next, in order to investigate the change of mouse virulence accompanying the passage in a mouse, a mouse is received about three shares, M-0, M-3, and M-5. fifty percent lethal dose It measured. The result is shown in Table 1. The day [ of infection / 13rd ] death rate showed "the death mouse / inoculation mouse" of front Naka. M-0 is  $4 \times 10^6$  CIU. Since a mouse was not killed at all in inoculation, it is on an expedient target. It considered as fifty percent lethal dose  $\Rightarrow 1.26 \times 10^7$  CIU / mouse. on the other hand — a mouse passage stock — each — strong virulence — being shown — M-3 and M-5 fifty percent lethal dose respectively — <31.6 CIU / mouse — and — It was calculated with 12.6 CIU / mouse.

[0052]

[Table 1]

----- The amount of inoculation A death mouse fifty	
percent lethal dose Virus (CIU/mouse) A /inoculation mouse (CIU/mouse)	
----- M-0 4x106 0/5 = > 1.26x107	
----- M-3 1x105 5/5 1x104 5 / 5 < 31.6 1x1035/5 1x102	
5/5 ----- M-5 1x104 5/5 1x103 5/5 12.6 1x102 5/5 1x101	
Being 5 ----- un-infected [ 2 / ] (-). 0/5	

----- [0053] Namely, avian influenza virus By carrying out a passage in mouse lungs, it comes to increase in the lungs of a mouse promptly, the virulence over a mouse also becomes strong quickly, and A/whistling swan/Shimane/499 / 83 (H5N3) stock is the 5th generation passage. fifty percent lethal dose It dropped to 1/1 million. In addition, about M-3, it is 102 CIU. Since all mice have been killed, it is . fifty percent lethal dose < 31.6 CIU Although carried out, the same virulence as M-5 may be shown.

[0054] [Example 2] From the production influenza virus stock (A/turkey/Ireland / 1378/83) (Kawaoka Y(H5N8).et al., Virology, 1987, 158:218-227) of a recombination Sendai Virus vector, template DNA was prepared according to reference "Kawaoka Y.et al., Virology, 1987, and 158:218-227." Primer HKH5-F () [ 5'-aag cgg ] ccg ctc tgt caa aat gga gaa aat-3' (array number: 1) and primer HKH5-R () [ 5'-aag cgg ccg cga tga act ttc acc cta agt ttt tct tac tacggc gta ] cgt taa atg caa att ctg cat t-3' (array number: 2) is used. HA gene on "NT/60/5/4" (J. A.Huddleston and G.G.Brownlee, 1982, Nucleic Acids Res.10:1029-1038) was amplified by the standard PCR method. the base sequence of a magnification fragment --- array number: --- it is shown in 3. pSeV(+)/18bV(-) (experimental medicine which digested the magnification fragment by NotI and digested the fragment of 1758 bases by NotI Vol.15 No.19 (special number) 1997; it inserted in Kato A., et al., and ENBO J.16:578-587 (1997)) ( drawing 3 ). Subsequently, the target plasmid was obtained by selecting the clone by which it was checked that carry out the transformation of this to Escherichia coli, extract DNA of each colony of Escherichia coli by the "Miniprep" method, and the DNA fragment of the magnitude expected is included. Cesium chloride density-gradient centrifugation refined the obtained plasmid.

[0055] According to the well-known approach, introduced the contrast plasmid without this plasmid and insertion into LLCMK2 cell, the Sendai Virus particle was made to reconfigure, and the hen's egg was made to inoculate and amplify the produced recombination Sendai Virus particle further (refer to the international public presentation 97/No. 16539 and international public presentation 97/No. 16538). When the collected virion was diluted to PBS and measured virus titer, it was 3x109 CIU (average).

[0056] Since LLCMK2 cell and valve flow coefficient-1 cell with which a recombination virus ("SeV/tukH5" is called) and the Sendai Virus ("SeV/V (-)" is called) of an old stock were infected did not have a big difference in each cell gestalt as a result of cell observation, the cell damage nature by the manifestation of subtype H5 HA was not accepted.

[0057] [Example 3] Immunochemistry-analysis 3-1 using anti-H5 antiserum A/Tern/South Africa/61 proliferated by the production growth hen's egg of influenza virus subtype H5 antiserum a stock (H5N3) You made it infected with the L cell of a mouse, and the cell was taken after infection in the 1st day, this cell was mixed with PBS and it considered as the emulsion 10%, and with formalin, after inactivation, hypodermically [ of a mouse ] was inoculated and Hmouse anti-5 <Tern/South Africa> antiserum was produced according to the conventional method.

[0058] Moreover, A/Tern/South Africa/61 (H5N3) stock proliferated by the growth hen's egg was settled by ultracentrifuge (30,000rpm, 90 minutes), immunity was carried out to the fowl according to the conventional method by having made this into the antigen, and Hfowl anti-5 <Tern/South Africa> antiserum was produced.

[0059] 3-2) The valve flow coefficient<sup>1</sup> cell mono-layer was made on the analysis chamber slide glass by the indirect fluorescent antibody technique. SeV/V (-) (contrast without insertion) or SeV/tukH5 which is an old stock in moi1 was infected with it. It cultivated by the culture medium without a blood serum after infection overnight. After removing culture medium, the cell was once washed by PBS. In room temperature 5 minutes, the cell was fixed by 0.5% formalin / PBS. The PBS solution which contained 0.2% NP-40 after washing was once added by PBS, and vitrification processing of a cell membrane was performed in room temperature 5 minutes. Next, the mouse anti-influenzavirus A / Tem/SA which 0.1 ml diluted 200 times were processed at the room temperature for 1 hour. Then, it washes 5 times by PBS, and the antibody (product made from commercial item Cappel) which finally combined FITC with the anti-mouse Ig (H+L) was acted by dilution 100 times, and 0.1 ml was made to act at a room temperature for 1 hour. Then, the speculum of the cover glass was covered and carried out with 80% glycerol / PBS after 5 times washing by PBS. Consequently, the fluorescence image of a cell was observed by the SeV/tukH five-senses stain cell unique target ( drawing 4 ).

[0060] 3-3) The western-blot-analysis BHK cell of an infected cell was cultivated so that it might become a mono-layer on the tissue culture plate of six holes. Next, SeV/V (-) or SeV/tukH5 was infected with this cell in moi 10. About 24 hours after, the cell was written, carried out centrifugal with the rubber policeman, for 6,000rpm 5 minutes, and cells were collected as precipitation. After adding 2xSDS sample buffer of 0.1 ml to these settlings as well as PBS of 0.1 ml, dissolving in them and heating at 90 degrees C for 5 minutes, it applied to SDS-PAGE.

[0061] The concentration of gel is 12.5% and blotting of after migration was carried out to the PVDF film in electrophoresis by the semi dry cleaning method. After an imprint, a part dyes the imprint film by Coomassie Brilliant Blue (CBB) as it is, and the remainder mixed mouse anti-H5 antiserum diluted with 3% of skim milk 500 times after blocking processing of a room temperature 1 hour, and was made to react at a room temperature for further 1 hour. Then, antiserum was sampled and it washed 4 times by the penetrant remover which consists of 20 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, and 0.1 % Tween 20. After washing, the anti-mouse IgG (product made from commercial item Cappel) which carried out peroxidase labelling was made to dilute and act 250 times at a room temperature similarly in addition for 1 hour. After washing 4 times by the penetrant remover, it was made to color again according to the approach of the Konica immuno stain kit finally.

[0062] Consequently, as for HA protein of influenza, it was shown by the BHK cell with which recombination Sendai Virus was infected in spite of the bottom of trypsin nonexistence that HA0 has cleft to HA1 and HA2 ( drawing 5 ).

[0063] 3-4) The \*\*\*\*\* urine water of the growth hen's egg which inoculated analysis SeV/V (-) or SeV/tukH5 of a purification Sendai Virus particle was collected on the 3rd. The liquid was collected, 9,000 rpm, centrifugal was carried out for 15 minutes and the corpuscle and the cell component were dropped on cooling supercentrifuge. The supernatant liquid was collected, it applied to ultracentrifuge (30,000rpm, 90 minutes) this time, and viruses were collected as precipitation this time. Several ml PBS was added to this precipitation, and it was made to suspend completely using an ultrasonic crusher. This suspension was calmly put on the topmost part of \*\*\*\*\* which consists of two-layer [ 60% and 20% of ], and it applied to density gradient centrifugation for 90 minutes by 27,000rpm. The virus liquid which came between 20% and 60% of layers was collected after centrifugal termination.

[0064] In this way, the collected purification virion was applied to SDS-PAGE, and Western blotting was performed using mouse anti-H5 antiserum to an influenza virus. Consequently, in SeV/tukH5, it was observed as a result of Coomassie dyeing and an immuno blot that HA protein of the influenza virus in purification virion has cleft to HA1 and HA2 ( drawing 6 ).

Therefore, it was concluded that a part of influenza virus HA was incorporated in a SeV particle.

[0065] Moreover, according to the conventional method, immunity was carried out to the fowl by having used as the antigen this purification SeV/tukH5 virion and SeV similarly refined as contrast, and anti-S eV / tukH5 antiserum and anti-S eV antiserum were produced, respectively. In order to confirm whether anti-S eV / tukH5 obtained antiserum reacts with the influenza virus of a subtype H5, the immuno blot was performed by using an influenza virus (A/whistling swan/Shimane/499/83 (H5N3) stock) as an antigen. Consequently, it was checked that the antiserum made to SeV/tukH5 virion has reactivity to HA molecule of a subtype H5 ( drawing 7 ). Also from this, it was proved that an influenza virus HA is incorporated in a SeV particle.

[0066] [Example 4] In the analysis SeV/tukH5 virion by the immunity electron microscope, in order to investigate whether H5 protein is carrying out localization on the surface of Sendai Virus, analysis by the immunity electron microscope was performed. SeV/tukH5 virions were collected having covered the \*\*\*\*\* urine water of the growth hen's egg which inoculated SeV/tukH5 over ultracentrifuge (28,000rpm, 30 minutes), and it suspended in distilled water. 5micro (1x10<sup>9</sup> a particle/ml) of this virus suspension I was dropped on the micro grid with a supporting lamella, and it was made to dry. Pretreatment is performed for 30 minutes by PBS which contains BSA 0.1%, the back-to-front processing liquid is sucked up through a filter paper, and mouse anti-H5 antiserum diluted with PBS which contains BSA 0.1% 200 times was dropped at the grid, and was made to react for 60 minutes in the state of moisturization. After washing 6 times by PBS, excessive moisture is sucked up through a filter paper, and the gold colloid indicator anti-mouse IgG (ISN) diluted with PBS which contains BSA 0.1% 20 times was dropped at the grid, and was made to react for 60 minutes in the state of moisturization. After washing 6 times by PBS, further, with distilled water, the rinse was carried out twice and the air dried was carried out. It dyed for 3 minutes of acetic-acid uranium 4%, and the air dried was carried out. Electron microscope A photograph was observed and taken in JEM-1200EXII (JEOL) ( drawing 8 ).

[0067] Consequently, since gold colloid was observed on the front face of a Sendai Virus particle, in SeV/tukH5 virion, having discovered H5 protein on the surface of virion was shown.

[0068] [Example 5] Immunity of the recombination Sendai Virus vector (a wild strain, a SeV/V (-) stock, and SeV(-)/tuk-H5) (1x10<sup>7</sup> CIU/25microL) which anesthetized lightly five to immunity of mouse by recombination Sendai Virus 1 mouse with the ether, and diluted it was carried out to the mouse by rhinovaccination. Mouse The ICR/Crj (CD-1) stock and the 3-weeks old male (8-10g) were used. The virus in lungs was measured after inoculating Sendai Virus on 0, 1, 3, 5, 7, and the 9th. Moreover, 0, 5, 7, 10, 14, and 28 days after, the antibody production in a blood serum was measured. Moreover, after infection 0, 1, and three days after, the viral isolation out of a spleen, liver, and blood was also tried. Blood used the heparinemia. In blood collecting, the ether small-cut the inguinal region skin after anesthesia open for the mouse lightly, the thigh condition pulse was cut with scissors and the blood which has bled was collected blood with the capillary tube pipet. In addition, if in charge of heparinemia extraction, it is heparin in an Eppendorf tube beforehand. 20microl is put in and it is a micropipette. The blood of 180microl was extracted and it mixed with it.

[0069] Anti-S eV ELISA IgG Purification virion of an HVJ Hamamatsu stock is used as an antigen at measurement of antibody titer (anti-Sendai Virus ELISA IgG antibody titer), and it is \*\*. H5 ELISA IgG In measurement of antibody titer, it is A/whistling swan/Shimane / 499/83 (H5N3). Let purification virion be an antigen. ELISA It measured in law (Table 2).

[0070] 5-2) A vaccine (fake inoculation) without a Sendai Virus vector, a Sendai Virus wild strain (10<sup>7</sup> CIU), Recombination Sendai Virus (A.Kato et al. and EMBO J.16:578-587 (1997))

without insertion (SeV/V (-)) (107 CIU), And the weight change of a mouse when carrying out rhinovaccination of SeV(-)/tuk-H5 (107 CIU) to a mouse, respectively, the macro-scopic lesion of lungs, and the measurement result of the virus multiplication in lungs are shown in drawing 9 R > 9. A remarkable weight change was not accepted through the observation period. SeV(-)/tuk-H5 An infection mouse is the 1st day after infection. 106-107 Although the virus multiplication of order was shown, it was eliminated from lungs quickly [ the 2nd or subsequent ones ], and is no longer completely detected after the 7th. The macro-scopic lesion of lungs was not serious-illness-ized so much, either. Moreover, separation of the virus from the organs and blood other than lungs was example negative [ all ].

[0071] 5-3) The time course of the antibody production of an immunity mouse is shown in Table 2. The antibody titer (it is "\*\* in a table, respectively HVJ" and "\*\* column of H5") to Sendai Virus and H5 protein rose with progress of a SeV(-)/tuk-H five-senses stain. In all the measured mice, the antibody response to both viral antigens was checked.

[0072]

[Table 2]

After infection Mouse SeV/V (-) SeV(-)/tuk-H5									
** ELISA-IgG antibody titer ELISA-IgG antibody titer Days A number									
** HVJ ** H5 ** HVJ ** H5					0 1 10				
<10<10 <10 2 10 <10 <10 <10 3 10< 10 <10 <10					5				
1 400 <10 20 <10 2 800 <10 10 <10 3 400 <10 <10 <10									
					7 1 2,000 <10 800 200 2 2,000 <10 800 20 3 1,000				
<10 800 40					9 1 800 <10 1 000 10 2 4,000 < 10 800				
100 3 4,000 <10 800 40					14 1 20,000 <10 8,000				
800 2 20,000 <10 10,000 4,000 3 10,000 <10 4,000 400									
					21 1 20,000 <10 ND ND 2 20,000 <10 ND ND				
					281 80,000 <10 80,000 1,000 2 20,000 < 10 80,000				
2,000					Positive control -1 (anti-HVJ antiserum)				
8,000 <10					Positive control -2 (anti-H5 antiserum) <10 20,000 Negative control (normal serum) <10 <10				

[0073] [example 6] the measurement mouse (an ICR/Crj (CD-1) stock, 3-weeks old male (8-10g)) of the defense ability to the challenge of the influenza virus of the immunity mouse by recombination Sendai Virus was anesthetized lightly, and was diluted with the ether — it rearranged and immunity of the Sendai Virus vector (SeV(-)/tuk-H5) (3x107 CIU/25microL) was carried out to the mouse by rhinovaccination. The mouse measured weight every day. It collected blood after inoculating Sendai Virus at the 2nd week, and the antibody production in a blood serum was measured. The half mouse carried out rhinovaccination of the recombination Sendai Virus vector (SeV(-)/tuk-H5) (5x107 CIU / mouse), and carried out the booster, and the mouse of the remaining one half was bred as it was. Avian influenza virus origin stock (M-5) 1x104 CIU which the 2nd week of the booster was made to condition to a mouse in an example 1 It challenged by pernasality (infection) and 0, 1, 2, 3, and the virus multiplication in lungs five days after were measured.

[0074] Anti-S eV ELISA IgG Purification virion of an HVJ Hamamatsu stock is used as an antigen at measurement of antibody titer, and it is \*\*. H5 ELISA IgG In measurement of antibody titer, it is A/whistling swan/Shimane / 499/83 (H5N3). Let purification virion be an antigen. ELISA It measured in law.

[0075] The weight change after Sendai Virus inoculation is shown in drawing 10 R > 0, and time amount progress of the weight change after the challenge of an influenza virus, the macro-scopic lesion of lungs, and the virus multiplication in lungs is shown in drawing 11 .

[0076] Effect remarkable in weight change was not accepted through the observation period to the challenge of an influenza virus by the Sendai Virus vaccination like the example 5 (

drawing 10 ). Moreover, the effect on the weight increase by the booster was not seen, either.

[0077] About the defense effectiveness over the challenge of an influenza virus, it is the 1st day of a challenge with a non-immunity mouse. 107 CIU A virus is detected, and it will increase further on the 2nd, decreases after the 3rd, and will be on the 5th. 105.5 It became order. According to this, reduction in weight was seen from the 2nd, the macro-scopic lesion of lungs also appeared from the 3rd, and one mouse died on the 4th.

[0078] On the other hand, although the amount of viruses in day [ of a challenge / 1st ] lungs was the almost same level as it of a non-immunity mouse with the immunity mouse (non-booster), the inclination which already decreases was seen on the second. The dying mouse was not seen although the extent was clearly weak and the lung lesion also became on the 5th as compared with it of a non-immunity mouse, although the loss weight was accepted in one animal among three animals, and it appeared. With the immunity mouse which gave the booster, virus multiplication was controlled nearly completely on the 1st day of a challenge. Although growth of a virus is allowed after the 2nd, the extent is it of a non-immunity mouse. 1/10 It was order. A loss weight was not accepted, either but the lesion of lungs was also very slight.

[0079] \*\* SeV Antibody and \*\* H5 Time amount progress of production (respectively — “\*\* HVJ” in a table — and — “— the column of anti-H5”) of an antibody was shown in Table 3 with the macro-scopic lesion of lungs, and time amount progress of influenza virus growth.

[0080]

[Table 3]

A mouse ELISA-IgG antibody titer Lungs Virus			
Days **	macro-scopic lesion (CIU/ml) A number ** HVJ ** H5		
The 2nd week of the immunity - 1 20,000 4,000			
(before a booster)	- 2 20,000 40	- 3 20,000 4,000	-4 20,000 20 - 5 20,000 1,000 - 610,000
2,000	The 4th week of the immunity		
Non-immunity - 1 ND () [ booster ] - 2 ND Two weeks after, - 3 ND Before a challenge			
Booster (-) -1 40,000 400 0 <20 -2 40,000 8 0000 <20 -3			
40,000 1,000 0 <20	booster (+) -1 160,000 4,000 0 <20 -2		
80,000 8,000 0 <20 -3	80,000 1,000 0 <20		
challenge Non-immunity - 1 <10 <10 06.34x10 <sup>6</sup> For the 1st day -2 <10 <10 0 1.07x10 <sup>7</sup> - 3			
<10 <10 0 4.35x10 <sup>6</sup>	Booster (-) -1 100,000 2,000 0 5.01x10 <sup>6</sup>		
- 2 100,000 2,000 05. 81x10 <sup>6</sup> -3	200 000 2,000 0 4.49x10 <sup>6</sup>		
Booster (+) -1 200, 0002, 000 0 4.00x10 <sup>1</sup> -2 400,000 4,000 0 4.00x10 <sup>1</sup> - 3 200,000 8,000 0			
4.00x10 <sup>1</sup>	challenge Non-immunity - 1 <10 <10 0		
3.10x10 <sup>6</sup> The 2nd day - 2 <10 &lt;10 0 2.15x10 <sup>7</sup> -3 <10 <10 0 1.46x10 <sup>7</sup>			
Booster (-) -1 100,000 200 0 2.13x10 <sup>5</sup> - 2 100,000 1000			
1.98x10 <sup>6</sup> -3 400,000 800 0 1.38x10 <sup>6</sup>	booster (+) -1 200,000		
2,000 0 4.99x10 <sup>5</sup> - 2 200,000 8,000 0 5.68x10 <sup>5</sup> - 3 100,000 2,000 0 3.91x10 <sup>6</sup>			
challenge Non-immunity - 1 <10 <10 0 1.82x10 <sup>6</sup>			
The 3rd day - 2 <10 <10 0 8.26x10 <sup>5</sup> -3 <10 <10 1 1.58x10 <sup>6</sup>			
booster (-) -1 160,000 2,000 0 2.75x10 <sup>5</sup> - 2 160,000 2 0000 3.80x10 <sup>5</sup> - 3 160, 0002, 000 0			
5.44x10 <sup>5</sup>	booster (+) -1 80,000 200 02.48x10 <sup>5</sup> - 2 40, 0001,		
000 1 3.29x10 <sup>5</sup> -3 80,000 8,000 1 2.48x10 <sup>5</sup>			
challenge Non-immunity - 1 <10 <10 0 1.57x10 <sup>5</sup> The 5th day - 2 <10 <10 5 4.03x10 <sup>5</sup> - 3 < 10			
<10 3 3.80x10 <sup>5</sup>	Booster (-) -1 80,000 8,000 3 1.98x10 <sup>5</sup> - 2		
80, 0008, 0002 2.06x10 <sup>5</sup> - 3 80,000 2001 6.73x10 <sup>5</sup>	Booster		
(+) -1 160,000 2,000 1 5.68x10 <sup>5</sup> -2 40,000 200 0 2.99x10 <sup>5</sup> -3 80,000 2,000 0			
4.62x10 <sup>5</sup>	[0081] [example 7] HIV-1 Construction		

7-1 with subtype E gp120 gene of recombination Sendai Virus plasmid construction -- the SeV vector which discovers the envelope protein gene (env) of a human immunodeficiency virus (HIV-1) next was built. HIV-1 subtype E gp120 used for construction of a SeV manifestation plasmid A gene is HIV-1 identified in Japan. It isolated from pNH2a-1 containing the env gene overall length of the NH2 (HIV-1NH2) origin which is R5 shares of E subtypes (Sato, H. et al., 1997, AIDS 11:396-397). HIV-1 which used SeV as the base The manifestation plasmid of a subtype E gp120 is reference "Kato, A. et al., 1997, and EMBO J.16. : 578-587, Yu, and D. et al., 1997, and Genes Cells 2 : It produced like 457-466" ( drawing 12 ). Simply, it is HIV-1. Subtype E env gp120 A gene (1,515 bp) A NotI tag primer pair NH2SU501A[5 added -- 'AAgCGGCGcAAGACAGTGGAAATGAGAGTGAAGGAGACACAGATG-3' -- /array number: -- 4(sense chain)] -- and -- NH2SU502B[5'-TTgcgg ccgcGATGAACCTTTCACCCTAAGTTTTTCTTACTACGGCGTACGtcaTCTTTTTTCTCTCTCC-3' / array number: It amplified by polymerase chain reaction (PCR) using 5(antisense strand)]. The small letter without the underline under array expresses a NotI recognition site. The capital letter with an underline is the saved interleaved array. 3'-GAA-5' It was minded and connected. New S of SeV and E signal are expressed. Small letter with an underline gp120 The stop codon inserted immediately after the open reading frame of a gene is expressed. E (conclusion) and S (initiation) signal make the imprint of gp120 inserted gene end, respectively, and have the function to make the imprint of N gene which is down-stream start ( drawing 12 ). . gp120 gene expression was designed so that it might be started with S signal of N gene of a SeV vector. The fragment which performed PCR using ExTaq polymerase (Takara Shuzo Co., Japan), and was amplified is after NotI cutting, pSeV(+)-18bV(-) (Kato, A. et al., 1997, and EMBO J.16. : It inserted in the NotI part of 578-587) directly, and Sendai Virus vector pSeV/gp120-E in which gp120 was included was obtained. HIV-1 The manifestation plasmid (Yu and D. et al., 1997, Genes Cells 2:457-466) which used pSeV with envgp120 of Subtype B (pNL432) as the base named pSeV/gp120-B, and was used for the experiment.

[0082] 7-2) HIV-1 gp120s The stock of the reconstruction recombination Sendai Virus (SeV) of recombination Sendai Virus to discover was prepared according to reference (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579), and determined virus titer. Simply on the plastics plate of diameter 60 mm 10% fetal calf serum (FCS) and an antibiotic ( ) [ 100 ] units/ml Penicillin G and 100microg/ml It cultivates until it becomes confluence (2x10<sup>6</sup> cells) 70 to 80% about the ape kidney origin cell strain LLCMK2 using the minimum essential medium (MEM) containing streptomycin. T7 polymerase Recombination vaccinia virus to discover vTF 7-3 ( ) [ Fuerst, T.R. et al., 1986, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 83:8122-8126, Kato, ] [ A. ] et al., 1996, and Genes Cells 1: 569-579 You made it infected in 2 PFU / cell. Transfection was carried out by the RIPOFE cushion method (DOTAP, Boehringer-Mannheim, USA) 1 hour after infection with the plasmid (pGEM-N of 24microg, pGEM-P of 12microg, and pGEM-L of 24microg) (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579) which discovers the virus protein which acts pSeV/gp120-E of 60microg on a transformer indispensable to generation of an overall-length Sendai Virus genome. The cell which performed transfection is cultivated by MEM of blood serum non-\*\* containing 40micro ag [ /ml ] cytosine arabinoside (araC) (Sigma, USA) and 100microg [ /ml ] rifampicin (Sigma, USA), minimizes the cytotoxicity by the vaccinia virus, and was made to make recovery of a virus max (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579). Cells were collected 48 hours after transfection, and after repeating freeze thawing 3 times and crushing a cell, it inoculated into the chorioallantoic membrane of the growth hen's egg of ten ages in day. \*\*\*\*\* urine water was collected three days after, and virus titer was determined. The potency of the collected Sendai Virus is the vaccinia virus which is 10<sup>8</sup> - 10<sup>9</sup> PFU/ml and was both contained. vTF 7-3 was 10<sup>3</sup> - 10<sup>4</sup> PFU/ml. Diluted to 10<sup>-6</sup>, it was made to re-amplify by the hen's egg, and the vaccinia virus was removed. The recombination virus

obtained by this 2nd passage was stocked, SeV/gp120-E or SeV/gp120-B was named, respectively, and it was used for future experiments. The plaque organization potency of a virus stock was infected with LLCMK2 cell, and was determined, and hemagglutination activity (HA) was determined with the "endo-point dilution method" (Kato, A. et al., 1996, Genes Cells 1:569-579). Generally the virus stock of the recombination virus which performed the passage twice by the hen's egg had the 10,240 HA unit [ 109 PFU/ml or ]/ml potency.

[0083] [Example 8] HIV-1 It is an ape kidney cell strain because of the manifestation of the manifestation recombination gp120 of the recombination gp120 of Subtype E, and preparation. valve flow coefficient-1 The cell was cultivated by the minimum essential medium (MEM) which contains fetal calf serum (FCS) and an antibiotic (100 units/ml penicillin G and 100microg/(ml) streptomycin) 10%. It cultivated by DMEM which 37 degrees C (pSeV/gp120-B or pSeV/gp120-E) of recombination Sendai Virus are infected in 10 PFU / cell for 1 hour, and does not contain a blood serum after washing by PBS once (Yu and D. et al., 1997, GenesCells 2:457-466). Culture supernatants are collected to various time amount, and it is HIV-1. gp120 production level was analyzed by Western blot using what pooled ten blood serums from the blood serum of the patient infected with one of the subtypes B or E. That is, a culture supernatant is mixed with the ethanol of 3 capacity, centrifugal was carried out for 30 minutes by 12,000g after 1-hour cooling at -80 degrees C, and precipitate was dissolved in the equivalent sample buffer for 2%SDS content PAGE (Daiichi Pure Chemical Co., Japan). A sample is applied to SDS-PAGE, and it imprints in electrophoresis to the film, and is HIV-1. The protein A (NEX146, Dupnt, USA) which diluted and incubated 500 times and carried out the blood serum pool of the patient infected with Subtypes E or B, the 125I label was added, and autoradiography was performed using BAS2000 (Fujix, Japan). Subtype E reference protein of the concentration of known [ quantum / of gp120 ] (HIV-1 of CM stock origin discovered by the baculovirus vector. a grant is made from subtype E gp120; "National Institute of Allergy and InfectiousDiseases AIDS Research and Reference Reagent Programn and USA") Lot number Phase dilution of 4-96196 was carried out, and Western blot analysis was performed with the sample.

[0084] The culture supernatant (200microl) of valve flow coefficient-1 cell which infected recombination SeV with the argention is mixed with the ethanol of 3 capacity (600microl), centrifugal was carried out for 30 minutes by 12,000g after 1-hour cooling at -80 degrees C, and precipitate was dissolved in the equivalent sample buffer for 2%SDS content PAGE (Daiichi Pure ChemicalCo., Japan). Electrophoresis of the sample of 5microl was carried out by the 4-20% polyacrylamide gradient gel containing SDS, and the argention was performed using the kit (BIO-RAD, USA).

[0085] It is HIV-1 envelope to the location of about 110 to 120 apparent molecular weight kDa as a result of the Western blot analysis. The band corresponding to gp120 was detected ( drawing 13 A). Production of recombination gp120-E was detected in 24 hours after infection, and became max in 72 hours after infection. The moving state was the same as that of it of recombination gp120-B by pSeV/gp120-B ( drawing 13 A and B (Yu and D. et al., 1997, Genes Cells 2:457-466)). In the culture supernatant, it rearranged and it was thought that, as for gp120-E, apparent molecular weight occupied about ten to 20 detected% which is about 100 to 120 kDa of the protein of the analysis of the protein image are main protein and according to the argention to the whole ( drawing 13 C). It is considered because a difference is in extent and pattern of glycosylation that width of face is in the molecular weight of the appearance of recombination gp120-E. It is HIV-1 which was produced by the SeV vector system in valve flow coefficient-1 cell and from which it rearranged and gp120-E was discovered by the baculovirus system in Sf-9 cell. Compared with gp120 (a grant is made from NIH AIDS Reagent Program) of a subtype E CM stock, the mobility of the electrophoresis in SDS-PAGE was late. This is considered to originate in extent of



glycosylation and the difference in a pattern in a mammalian cell and an insect cell. By culture of 6 hole plate, it reached [ ml ] in about 2microg /in 72 hours after infection, judging from the comparison with the protein of the known concentration of the rearrange and according [ the amount of gp120-E ] to Western blot analysis CM gp120 baculovirus product secreted by the culture supernatant of valve flow coefficient-1 cell ( drawing 13 A ), and reached [ ml ] in 6microg /by 50ml bottle culture in 72 hours after infection. To it, commercially, by available gp120 quantum kit (HIV-1 gp120 Antigen Capture Kit and (Advanced Biotechnologies, USA) gp120 Capture ELISA kit (Immuno Diagnostics, Inc.USA) are included), it was not able to rearrange and the quantum of the gp120-E was not able to be carried out. These kits are HIV-1. It is designed so that gp120 of Subtype B may be detected, and it is thought that it is based on the difference on the antigen of gp120 of the subtypes E and B of HIV-1.

[0086] Next, HIV-1 Subtype E The single step affinity column chromatography which combined monoclonal antibody (mAb) TQ four B15-2 (Emini, E.A.et al., 1992, Nature 355(6362):728-730) to V3 loop formation refined uniform recombination gp120-E from the culture supernatant. The culture supernatants of valve flow coefficient-1 cell infected in SeV/gp120-E were collected 72 hours after infection. 5ml mAb TQ four B15-2 was combined, and it let 50ml of culture supernatants collected to the immuno affinity column (Affi-Gel Hz Immunoaffinity Kit (Bio Rad, USA)) which equilibrated by PBS pass. A column is 0.2M [ 10ml ] about the protein which washed twice by 10ml PBS and was combined. Glycine-HCl buffer It was eluted by pH4.0. Protein fraction It neutralized to pH7.4 by 1 M Tris-HCl pH9.5, saved at -80 degrees C, and was used for the experiment. The recovery in an affinity column was about 60%. The argentation color image of refined protein is shown in drawing 13 C (lane P). [0087] [Example 9] It is HIV-1 in order to verify the difference on the antigen of serological reactivity recombination gp120-E of the recombination gp120 to patient's serum, and recombination gp120-B. The reactivity of each protein to the blood serum pool (four blood serums) of the patient infected with a patient's blood serum pool (seven blood serums) or Subtype B infected with Subtype E was analyzed by Western blot. As shown in drawing 14 , the subtype E blood serum and the subtype B blood serum reacted specifically with the recombination gp120 of the subtype corresponding to each ( drawing 14 ).

[0088] [Example 10] In order to analyze the function of recombination gp120-E of the functional analysis SeV origin of recombination gp120-E, the avidity to CD4 was measured by FACS using the rough purification culture supernatant of valve flow coefficient-1 cell infected with SeV/gp120-E. Specifically, it is Homo sapiens CD4+. T cell stock MT4 cell (2x10<sup>6</sup>) was incubated at the room temperature for 1 hour by 5microg [/ml ] recombination gp120-E and MEM which contains FCS 10%. It is HIV-1 after washing and to a cell at PBS. The above-mentioned mouse mAb (TQ four B15-2) to the V3-loop formation of Subtype E was made to react for 45 minutes at 4 degrees C. In FITC joint sheep F(ab')<sub>2</sub> fragment (Pharmaceuticals Inc., USA) to Mouse IgG, 4 degrees C of united antibodies were made to react for 45 minutes, and they carried out level. The difference in fluorescence intensity was measured using FACScan (Becton Dickinson, USA), and average fluorescence intensity was determined. In another experiment, it incubated at the room temperature by various recombination gp120-E for 1 hour, and 4 degrees C incubated MT4 cell for 45 minutes by anti-CD4 mAb Leu-3a (Becton Dickinson, USA) further. The label was carried out by the FITC association F (ab') as mentioned above, and FACS analysis was performed.

[0089] Consequently, it became clear that it was combinable with the front face of MT4 cell which was made to discover by the SeV vector and on which it rearranges and gp120-E discovers CD4 ( drawing 15 A ). Moreover, association to the cell surface of anti-CD4 antibody (Leu3a) (Yu, D.et al., 1997, Genes Cells 2:457-466) by which competing on association to the cell surface of gp120 and a solid target is known was checked by the dosage dependence target of recombination gp120-E ( drawing 15 B ). In the control experiment, the culture

supernatant of valve flow coefficient-1 cell with which SeV which is a parent virus was infected showed neither CD4 avidity nor the contention to association of Leu3a ("C" in drawing 15 A and B). Therefore, it was shown that gp120-E has the activity which recognizes specifically CD4 which are the main acceptors of HIV-1 like natural gp120 (Yu and D.et al., 1997, Genes Cells 2:457-466).

[0090] [Example 11] The serological reactivity in the enzyme immunoassay (EIA) of the recombination gp120 of the serological reactant analysis SeV origin of EIA was verified comparing with V3 loop-formation peptide EIA (Pau and C.P.et al., 1993, AIDS 7:337-340).

[0091] In order to obtain the blood serum of a HIV-blood serum positivity, blood serums of a HIV-blood serum positivity (seropositive) of a total of 164 were collected from the HIV-1 infection patient of Thailand (n= 20), Vietnam (n= 44), Malaysia (n= 3), Cambodia (n= 9), and Japan (n= 88). The HIV negative contrast blood serum of 24 was also extracted from the healthy blood serum negative (seronegative) Japanese. It authorized whether about these blood serums, it would have an antibody to HIV-1 subtypes E or B gp120 by V3-peptidase immunoassay (EIA) (Pau and C.P.et al., 1993, AIDS 7:337-340). moreover, envelope of HIV-1 the array of 324 bases of C2/V3 field -- reference -- " -- Kusagawa, S.et al., 1998, and AIDS Res.Hum.Retroviruses 14 : According to 1379-1385", it amplified by PCR from PBMC or a blood serum, and the array was determined. Network analysis was performed by the next door method recently using the base sequence of env C2/V3 field, and the hereditary subtype was determined. All the samples of 76 of the countries origin in Southeast Asia are HIV-1. Having received infection of Subtype E was checked. Japan -- all -- the HIV positivity blood serum of 88 originates in the hemophiliac infected with the beginning of the 1980s by transfusion of the blood product of the North America origin. They are HIV-1. Infection of Subtype B Popularity was won (). [ Hattori, ] [ T.et ] al., 1991, and AIDS Res. Hum.Retroviruses 7: 825-830, Komiyama, and N. et al., 1989, and AIDS Res.Hum.Retroviruses 5: 411-419, Shimizu, N.et al., 1992, J.Mol.Evol.35 : 329-336. The HIV positivity blood serum (Subtypes E are 76 blood serums and Subtypes B are 88 blood serums) of these 164 and the electronegative blood serum of contrast of 21 were used.

[0092] According to the preliminary experiment, the conditions which fix the recombination gp120 of the SeV origin by concentration 15 ng/well, and dilute a blood serum 1:8,000 times were the the best for EIA using the SeV origin recombination gp120. In the case of EIA using a V3-peptide, it is HIV-1. It carried out on the conditions using the blood serum of dilution 200 times with V3 loop-formation peptide (14mer) 1microg/well of Subtypes E and B (Pau and C.P.et al., 1993, AIDS 7:337-340). At 4 degrees C, it incubated overnight on the microtiter EIA plate (Immulon II microtiter plate, Dynatech Laboratories, USA), and recombination gp120 or V3 loop-formation peptide was fixed on it. By PBS (milk buffer) which contains skim milk and 0.3%Tween 20 5%, after blocking, It washes by PBS which contains Tween 20 0.05%, and is blood serum [HIV-1 of 8,000 time dilution. Subtype E infection tie people (n= 11), HIV-1 37 degrees C incubates for 1 hour by the milk buffer containing subtype B infection Japanese hemophiliac (n= 21) or healthy person (n= 20)]. 37 degrees C incubated for 1 hour by horseradish peroxidase joint goat anti-Homo sapiens IgG (Bio-Rad, USA, Catalog number 172-1001) who diluted the antibody combined with the well 2,000 times. o-phenyl diamine dihydrochloride and the substrate (GENEVAVIA MIX, Sanofi Diagnostic Pasteur, France) containing H2O2 were added, and it was made to color at a room temperature for 6 minutes. Reaction 1N H2SO4 was added and it was made to end. The absorbance of 492nm was measured and reactivity was determined ( drawing 16 ).

[0093] The value (0.3) which added the 7 times as many numeric value as standard deviation to the average absorbance of a negative control was made into the cut-off value among drawing ( drawing 16 A). As shown in drawing 16 B, it rearranged, and the subtype specific antibody was detected with high singularity ( drawing 16 B), and the result was in agreement

with heredity data 100% in EIA (EIA/SeV) using gp 120-E and B which made it discovered by the SeV system. EIA using recombination gp120-E or recombination gp120-B had one about 1,000 times the sensibility of this compared with the V3 peptide EIA ( drawing 17 ). These are HIV-1 to that (about 76 in 76 blood serums, and a subtype B sample, it is [ sample / subtype E ] 88 in 88 blood serums) which was able to detect the subtype specific antibody by 100% of sensibility. The sensibility of the peptide EIA using V3 loop-formation peptide of Subtype E and MN stock (PEIA) was 90.8% (69 in 76), and 76.1% (67 in 88) to each. Hereditarily, it is HIV-1. It is HIV-1 although it is Subtype E. By PEIA using V3 loop-formation peptide of Subtype E, recombination gp120-E showed unexceptional specific reactivity also to the blood serum sample which is seven as which reactivity was not regarded. Also hereditarily, the blood serum sample of 21 which similarly indicated the serological reaction to be recombination gp120-B although PEIA using V3 loop-formation peptide of MN stock did not show reactivity is HIV-1. It was checked that it is Subtype B.

[0094] The serological reactivity of the SeV origin recombination gp120 was further verified using the different blood serum panel. A blood serum panel contains the blood serum (a grant is made from Dr.Osmanov, WHO, Switzerland, Dr.Harvey Holmes, NISHC and Dr.Johnathan Weber, and UK) of 20 collected through the WHO panel G (n= 8) and "UNAIDS Network for HIV isolation and characterization." This blood serum panel (n= 28) is HIV-1. The blood serum (it is one blood serum from five blood serums and Uganda in Rwanda) of Subtype A, seven blood serums (Brazil) of Subtype B, four blood serums (Brazil) of Subtype C, four blood serums (Uganda) of Subtype D, six blood serums (Thailand) of Subtype E, and one blood serum of Subtype F are included (Brazil).

[0095] Drawing 18 B expresses the EIA reactivity of recombination gp120-E (axis of ordinate) to each blood serum originating in the country of these plurality, or recombination gp120-B (axis of abscissa) with two-dimensional. drawing shows -- as -- HIV-1 Subtype E and the subtype B blood serum reacted specifically with the recombination gp120 of the same subtype. To it, reflecting the blood serum of other subtypes having a nonspecific subtype, it reacted only on low level and any inclinations of a reaction were not accepted to be recombination gp120-E and recombination gp120-B, either.

[0096]

[Effect of the Invention] This invention enabled it in the former to manufacture the vaccine to the difficult strong poison type influenza. Since toxicity can manufacture low the Sendai Virus vector for manufacturing the influenza vaccine of this invention using a hen's egg like the conventional influenza vaccine unlike the influenza virus itself, the manufacture of a safe and simple influenza vaccine of it is attained. Moreover, since the pathogen origin protein manufactured by the Sendai Virus vector of this invention has high immunoreactivity, it can be suitably used as the protein for immunogens, or protein for immunity analysis.

[0097]

[Layout Table]

SEQUENCE-LISTING<110> DNAMEC-Research-Inc.<120> Vaccines and curative agents using-Sendai-virus-vector.<130> D3-006<140><141><160> 5 <170> PatentIn Ver. 2.0<210> 1<211> 30<212> DNA<213> Artificial Sequence<220> <223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence <400> 1 aagcgccgc tctgtcaaaa tggagaaaat 30 <210> 2 <211> 70<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized primer sequence <400> 2 aagcgccgc gatgaacttt caccctaagt tttcttact acggcgtacg ttaaatgcaa 60 attctgcatt 70 <210> 3 <211> 1770<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><221> CDS <222> (20) .. (1717) <220> <223> Description of Artificial Sequence : an artificially amplified HA sequence <400> 3 aagcgccgc tctgtcaaa atg gag gaa ata gtg ctt ctt ttt gca ata gtc 52 Met Glu Glu Ile Val Leu Leu Phe Ala Ile Val 1 5 10 agt ctt gct aga agt gac cag att tgc att ggt tac cat gca aac aac 100

Ser Leu Ala Arg Ser Asp Gln Ile Cys Ile Gly TyrHis Ala Asn Asn 15 20 25 tca aca aaa cag gtc  
 gacaca ata atg gaa aag aat gtt act gtcaca 148 Ser Thr Lys Gln Val Asp Thr Ile Met Glu Lys  
 Asn Val Thr Val Thr 30 35 40 cat gcc caa gac ata ctt gaa aaa aca cac aac ggg aag ctc tgc  
 agc 196 His Ala Gln Asp Ile Leu Glu Lys Thr His Asn Gly Lys Leu Cys Ser 45 50 55 cta aat  
 ggagtg aag cct ctc att ttg agg gat tgt agt gta gct gga 244 Leu Asn Gly Val Lys Pro Leu Ile Leu  
 Arg Asp Cys Ser Val Ala Gly 60 65 70 75tggtc ctcgga aat cct atg tgt gac gaa ttc ctt aat gtg  
 cca gag 292 Trp Leu Leu Gly Asn Pro Met Cys Asp Glu Phe Leu Asn Val Pro Glu 80 85 90  
 tgg tct tac ata gta gaa aag gat aat cca gtc aat ggc ctt tgc tac 340 Trp Ser Tyr Ile Val Glu Lys  
 Asp Asn Pro Val Asn Gly Leu Cys Tyr 95 100 105 cca-ggg-gat-ttc-aac gac-tac-gaa-gaa-ctg  
 aaa cat cta tta agt tgt 388 Pro Gly Asp Phe Asn Asp Tyr-Glu-Glu-Leu-Lys His Leu Leu Ser  
 Cys 110 115 120 acg-aaa-cat-ttt-gag aaa-att-cga-atc-atc ccc-aga-gattcc tgg ccc 436 Thr  
 Lys His Phe Glu Lys Ile Arg Ile Ile Pro Arg Asp Ser Trp Pro 125 130 135 aac cat gaagcc tca  
 tta gga gta agc tct gca tgt cca tac aat ggg 484 Asn His Glu Ala Ser Leu Gly Val Ser Ser Ala  
 Cys Pro Tyr Asn Gly140 145 150 155agg tct tct ttt ttc agg aat gtg gta tgg ctt atc aaa aag aac  
 aat 532 Arg Ser Ser Phe Phe Arg Asn Val Val Trp Leu Ile Lys Lys Asn Asn 160 165 170 gca  
 tac cca aca ata aag agg agt tac agc aat act aat aaa gaa gat 580 Ala Tyr Pro Thr Ile Lys Arg  
 Ser Tyr Ser Asn Thr Asn Lys Glu Asp 175 180 185 ctt cta ata ctg tgg gga att cac cat cct aat  
 gat gca gca gag caa 628 Leu Leu Ile Leu Trp Gly Ile His His Pro Asn Asp Ala Ala Glu Gln 190  
 195 200acc aag ctc tatcaa aac cca acc act tat gtc tcc gtc gga aca tca 676 Thr Lys Leu Tyr  
 Gln Asn Pro Thr Thr Tyr Val Ser Val Gly Thr Ser 205 210 215 aactg aat caaaga tca att cca  
 aaa ata gcc act agg ccc aaa tta 724 ThrLeu Asn Gln Arg Ser Ile Pro Lys Ile Ala Thr Arg Pro  
 Lys Leu220 225 230 235 aat ggg caa agtggaaga atg gaa ttc ttt tgg acg att ttg aag cca 772  
 Asn Gly Gln Ser Gly Arg Met Glu Phe Phe Trp Thr Ile Leu Lys Pro 240 245 250 agt gat acc  
 atc aat ttt gag agt aat gga aac ttc att gct cca gag 820 Ser Asp Thr Ile Asn Phe Glu Ser Asn  
 Gly Asn Phe Ile Ala Pro Glu 255 260 265 tat gcc tat aaa att gtc aag aag ggg gac tca gca atc  
 atg aaa agt 868 Tyr Ala Tyr Lys Ile Val Lys Lys Gly Asp Ser Ala Ile Met Lys Ser 270 275  
 280gga ttg gaa tatggt aac tgc aat act aag tgt caa act cca ata ggt 916 Gly Leu Glu Tyr Gly Asn  
 Cys Asn Thr Lys Cys Gln Thr Pro Ile Gly 285 290 295 gcg-ata-aat-tcc-agc  
 atg-cca-ttc-cac-aat ata cat cct ctt acc att 964 Ala Ile Asn Ser Ser Met  
 Pro-Phe-His-Asn-Ile His Pro Leu Thr Ile300 305 310 315gga gaa tgc ccc aaa tac gtg aaa  
 tcagat aga ttg gtc ctt gca act 1012 Gly Glu Cys Pro Lys Tyr Val Lys Ser Asp Arg Leu Val Leu  
 Ala Thr 320 325 330 gga ctc agg aac acc cct caa aga aaa aga aaa aag aga ggt cta ttt 1060  
 Gly Leu Arg Asn Thr Pro Gln Arg Lys Arg Lys Lys Arg Gly Leu Phe 335 340 345 gga gct atg  
 gca ggc ttc ata gag ggg gga tgg cag gga atg gta gac 1108 Gly Ala Met Ala Gly Phe Ile Glu Gly  
 Gly Trp Gln Gly Met Val Asp 350 355 360ggt tgg tat ggttac cac cat agc aac gag cag ggg agt  
 gga tat gct 1156 Gly Trp Tyr Gly Tyr His His Ser Asn Glu Gln Gly Ser Gly Tyr Ala 365 370  
 375 gcagac aaa gaatcc acc caa aag gca ata gat gga atc acc aat aag 1204 AlaAsp Lys Glu Ser  
 Thr Gln Lys Ala Ile Asp Gly Ile Thr Asn Lys380 385 390 395 gtc aac tca atcattgac aaa atg aac  
 acc cag ttt gag gca gtt ggg 1252 Val Asn Ser Ile Ile Asp Lys Met Asn Thr Gln Phe Glu Ala Val  
 Gly 400 405 410 aag gaa ttt aat aac tta gag aga aga ata gaa aat ttg aac aag att 1300 LysGlu  
 Phe Asn Asn Leu Glu Arg Arg Ile Glu Asn Leu Asn Lys Ile 415 420 425 ttg gaa gac ggg ttt cta  
 gat gtt tgg act tat aat gct gaa ctt cta 1348 Leu Glu Asp Gly Phe Leu Asp Val Trp Thr Tyr Asn  
 Ala Glu Leu Leu 430 435 440gtt ctc atg gaaat gaa aga act cta gat ttt cat gac gca aac gta  
 1396 Val Leu Met Glu Asn Glu Arg Thr Leu Asp Phe His Asp Ala Asn Val 445 450 455 aagago  
 ctt tacgac aag gtt cga cta cag ctt aag gat aat gca agg 1444 LysSer Leu Tyr Asp Lys Val Arg  
 Leu Gln Leu Lys Asp Asn Ala Arg460 465 470 475 gaa ctg ggt aatggttgt ttc gag ttc tac cat  
 aaa tgt gac aat gaa 1492 Glu Leu Gly Asn Gly Cys Phe Glu Phe Tyr Hi  
 s-Lys-Cys-Asp-Asn-Glu 480 485 490 tgt atg gaa agc atc-aga-aac-gga-aca tat aac tat cca  
 cag tat tca 1540 Cys Met Glu Ser Ile Arg-Asn-Gly-Thr-Tyr Asn Tyr Pro Gln Tyr-Ser 495 500  
 505 gaa gag gca aga cta aac agg gaa gaa ata agt ggg atc aaa ttg gaa 1588 Glu Glu Ala Arg Leu

Asn Arg Glu Glu Ile Ser Gly Ile Lys Leu Glu 510 515 520 tca atg gga atttat caa ata ctgtcaatt  
tat tca aca gtg gcg agt 1636 Ser Met Gly Ile Tyr Gln Ile Leu Ser Ile Tyr Ser Thr Val Ala Ser  
525 530 535 tcccta gca ctggca atc atg ata gct ggt cta tct ttc tgg atg tgc 1684 Ser Leu Ala  
Leu Ala Ile Met Ile Ala Gly Leu Ser Phe Trp Met Cys 540 545 550 555 tcc aat gga tca ttg cag  
tgc aga att tgc att taacgtacgc cgtagtaaga 1737 SerAsn Gly Ser Leu Gln Cys Arg Ile Cys Ile  
560 565 aaaacttagg gtgaaagttc atcgcggcgc ctt 1770 <210> 4 <211> 46<212> DNA <213>  
Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence: an artificially synthesized  
primer sequence <400> 4 aagcgccgc aagacagtgg aaatgagagt gaaggagaca cagatg 46 <210> 5  
<211> 69<212> DNA <213> Artificial Sequence<220><223> Description of Artificial Sequence:  
an artificially synthesized primersequence <400> 5 ttgcggcgc gatgaacttt caccctaagt  
ttttcttact acggcgtaag tcatttttt 60 tctctctcc 69

---

[Translation done.]

**\* NOTICES \***

**JP0 and NCIP1 are not responsible for any damages caused by the use of this translation.**

- 1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
- 2.\*\*\* shows the word which can not be translated.
- 3.In the drawings, any words are not translated.

---

**DESCRIPTION OF DRAWINGS**

---

**[Brief Description of the Drawings]**

**[Drawing 1]** It is drawing having shown time amount progress of the virus multiplication in lungs in the mouse when carrying out the passage of the avian influenza virus with a mouse, weight change of a mouse, and the macro-scopic lesion of lungs. A cross joint means that the mouse died.

**[Drawing 2]** It is drawing having shown time amount progress of the virus multiplication in lungs when infecting the Tori origin influenza virus of an egg passage stock (M-0), the 3rd (M-3) generation of the mouse passage, and the 5th (M-5) generation of the mouse passage with a mouse in 1x10<sup>4</sup> CIU, weight change of a mouse, and the macro-scopic lesion of lungs. A cross joint means that the mouse died.

**[Drawing 3]** It is drawing showing the structure of the Sendai Virus vector incorporating an influenza virus HA gene. The DNA fragment containing HA gene was built into the NotI part of a Sendai Virus vector. "E" and "S" express the conclusion array of an imprint and imprint initiation array of Sendai Virus, respectively. "N", "P", "M", "F", "HN", and "L" express the gene of Sendai Virus.

**[Drawing 4]** It is a microphotography showing HA recombination Sendai Virus (SeV/tukH5) using Hanti-5 <Tern/SA> fluorescent antibody, and the chromatic figure of the contrast (SeV/V (-)).

**[Drawing 5]** It is drawing showing the result of the Western blot analysis of the protein extracted from the recombination Sendai Virus production cell using anti-influenza H5 antibody.

**[Drawing 6]** It is drawing showing the result of SDS-PAGE of the protein extracted from the purification Sendai Virus particle, and the Western blot analysis.

**[Drawing 7]** It is drawing showing the result of having analyzed the reactivity of the fowl antiserum which considered as the antigen, carried out immunity of the purification Sendai Virus (SeV/tukH5) particle, and produced it. It is

shown that SeV, SeV/tukH5, and FluV migrated the protein extracted from SeV/V (-), SeV/V (-), and an influenza virus, respectively.

[Drawing 8] It is the immunity electron microscope photograph in which the localization of H5 protein in SeV/tukH5 (right) virion is shown. SeV/V (-) and the (left) were used for contrast.

[Drawing 9] It is drawing having shown time amount progress of the virus multiplication in lungs in the mouse when inoculating recombination Sendai Virus into a mouse, weight change of a mouse, and the macro-scopic lesion of lungs. A cross joint means that the mouse died.

[Drawing 10] It is drawing showing the weight change in inoculation of the recombination Sendai Virus to a mouse, and the challenge of an influenza virus. An upper case is Sendai Virus un-inoculating, and the middle is  $3 \times 10^7$  CIU about Sendai Virus. Inoculation and the lower berth are  $3 \times 10^7$  CIU about Sendai Virus. After inoculation and  $5 \times 10^7$  CIU The case where a booster is covered is shown.

[Drawing 11] It is drawing having shown time amount progress of the growth in lungs of the influenza virus in the mouse when performing inoculation of the recombination Sendai Virus to a mouse, and the challenge of an influenza virus, weight change of a mouse, and the macro-scopic lesion of lungs. \*\* HVJ antibody titer (white) and \*\* H5 antibody titer (black) was shown in the lower berth.

[Drawing 12] HIV-1 Plasmid for recombination Sendai Virus production which discovers a subtype E gp120 (SeV/gp120-E) pSeV/gp120-E It is drawing showing construction. plasmid pSeV(+) 18 which are made to amplify the DNA fragment with which the transcriptional control signal (E and S) of SeV was added immediately after the open reading frame of gp120 using a primer with a NotI tag, and generate a SeV genome overall length (15,402 bases) — it inserted in the NotI part of bV (-).

[Drawing 13] It is drawing showing the manifestation of recombination gp120-E from the recombination Sendai Virus (SeV/gp120-E) in valve flow coefficient-1 cell. (A) is the culture supernatant of valve flow coefficient-1 cell with which SeV/gp120-E was infected. Time amount progress of production of the protein contained in 100microl is shown. HIV-1 made to discover by the baculovirus system The recombination gp120 of a subtype E CM stock was used as a calibration marker (50ng-500microg). HIV-1 after imprinting on the film from gel Western blot analysis was performed by using as a probe the pool of the blood serum of ten patients from Thailand infected with Subtype E. (B) shows the result of having determined the amount of SeV/gp120-E in the culture supernatant in each time amount of valve flow coefficient-1 cell with which SeV/gp120-E was infected from Western blot of Panel A. (C) — parent Sendai Virus (SeV(+))18bV(-) (lane "wt") and SeV/gp120-B (lane B) — or — The result of the argentation of the culture

supernatant of valve flow coefficient-1 cell with which SeV/gp120-E (lane E) was infected is shown. Each culture supernatants were collected in 72 hours after infection. mAb TQ four B15-2 Electrophoresis also of the SeV/gp120-E refined through the culture supernatant of valve flow coefficient-1 cell which infected SeV/gp120-E with the affinity column was carried out to coincidence (lane P). MW shows a press theine size marker. An arrow head expresses the location of the recombination gp120 of the SeV origin.

[Drawing 14] It is drawing showing the Western blot analysis of the recombination gp120 of the SeV origin. HIV-1 Seven patients or HIV-1 infected with Subtype E It is the result of analyzing the serological reactivity of the blood serum of four patients infected with Subtype B, and recombination gp120-E or recombination gp120-B by Western blot. The probe was carried out by the blood serum which migrated on each lane and diluted the culture supernatant (15microl) which contains recombination gp120-E or (lane E) recombination gp120-B (lane B) about 100 ngs 500 times. MW shows the location of a press theine size marker. An arrow head expresses the location of the recombination gp120 of the SeV origin.

[Drawing 15] It is drawing which was produced by SeV/gp120-E and in which rearranging and showing the result of the functional analysis of gp120-E. (A) is CD4 manifestation Homo sapiens T cell stock. Association of recombination gp120-E to MT4 is shown. MT4 cell is HIV-1. Anti-V3 loop-formation mouse mAb TQ four B15-2 produced to V3 loop-formation peptide of Subtype E Incubated, the FITC joint anti-mouse IgG sheep F(ab')<sub>2</sub> was made to react further, and FACScan detected. (B) is drawing showing inhibition of association of anti-CD4 mAb (Leu3a) to MT4 cell when pre incubating a cell by recombination gp120-E of the amount illustrated beforehand. "C" is contrast using the culture supernatant of the cell with which a parent virus (SeV) was infected among drawing.

[Drawing 16] It is drawing which was produced by recombination SeV and in which rearranging and showing the serological reactivity of gp120. (A) shows the reactivity of recombination gp120-E which used the blood serum panel, and recombination gp120-B. A blood serum panel is HIV-1 of 88. A subtype B positivity blood serum and HIV-1 of 76 A subtype E infection blood serum and the blood serum of the HIV-1 blood serum negative healthy person of 21 are included. The blood serum diluted 8,000 times was used for EIA. About recombination gp120-E or recombination gp120-B, reactivity was determined by measurement of the absorbance (OD) in 492nm. O The reactivity in each blood serum sample is shown. The cut-off value (0.3) is almost the same as the value which added 7 times of standard deviation (SD) to the average absorbance of the negative control of 21 (dotted line). (B) is drawing showing the singularity of EIA which used the recombination gp120 of the SeV origin.



The reactivity (OD492) of each blood serum (8,000 time dilution) to recombination gp120-E (axis of ordinate) or recombination gp120-B (axis of abscissa) was plotted two-dimensional. O HIV-1 A subtype E blood serum and \*\* are HIV-1. A subtype B blood serum is expressed. The reactivity of the blood serum to recombination gp120-B rearranges a dotted line, and it expresses a location when the same as the thing to gp120-E. The EIA system using gp120 of the SeV origin in each plot being clearly divided into one side of a dotted line is HIV-1. It was shown that the subtype specific antibody to Subtypes E and B is detectable.

[Drawing 17] It is drawing showing the result of having measured the sensibility of EIA using gp120 of the SeV origin with the V3 peptide EIA. Phase dilution of the blood serum of the patient infected with HIV-1 subtype B or Subtype E or a blood serum negative healthy person is carried out. Recombination gp120-E, recombination gp120-B, V3 peptide PND-E (HIV-1 V3 peptide originating in the consensus sequence of Subtype E), Or the reactivity over PND-MN (V3 peptide originating in MN stock which is a isolation stock seen typically in North America or Europe) (Pau and C.P.et al., 1993, AIDS 7:337-340) was investigated. Two were chosen from the blood serum belonging to each category as arbitration, and the average was plotted. A white round head is rearranged, a white trigonum rearranges the reactivity of the subtype E blood serum to gp120-E, and an empty diamond shows the reactivity of a subtype B blood serum [ as opposed to / in a white rectangular head / PND-MN for the reactivity of a subtype E blood serum / as opposed to PND-E for the reactivity of the subtype B blood serum to gp120-B ]. Black dot black, a black trigonum, and a black rectangular head show recombination gp120-E of a blood serum negative blood serum sample, recombination gp120-B, and the reactivity over PND-MN, respectively.

[Drawing 18] It is drawing showing the serological reactivity of the recombination gp120 of the SeV origin to the blood serum panel containing a part of known hereditary subtype (HIV-1 from Subtype A to H). (A) shows the reactivity (OD492) of recombination gp120-E which used the blood serum panel, or recombination gp120-B. (B) rearranges and plots the reactivity in EIA of each blood serum panel to gp120-E (axis of ordinate) or recombination gp120-B (axis of abscissa) two-dimensional. every — HIV-1 The blood serum of a subtype expressed with the symbol shown in the insertion Fig.

---

[Translation done.]

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**